

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DE L'ÉLÉMENT DE RÉPONSE À L'INSULINE
SUR LA RÉGION PROMOTRICE DU GÈNE AVIAIRE
DE LA STÉAROYL COA DÉSATURASE 1

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

OMAR ARFA

SEPTEMBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Les résultats obtenus dans ce travail ont été publiés dans *Journal of Cell Communication and Signaling*

Mauvoisin D, Rocque G, **Arfa O**, Radenne A, Boissier P and Mounier C. Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearoyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver. *J Cell Commun Signal.* 2007 Sep;1(2):113-25

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de maîtrise Catherine Mounier qui m'a accueilli dans son laboratoire et qui m'a permis d'apprendre beaucoup de choses qui me serviront pour toujours. Je la remercie également pour sa présence, son soutien continu et ses précieux conseils.

Je remercie tous mes collègues et amis qui sont passés par le laboratoire : Caroline Martel, Sabine Sawadogo, Anne Radenne, Murielle Akpa, Daniel Mauvoisin et Mister Gabriel Rocque.

Il ne faut pas oublier toutes les personnes du 3ème étage du pavillon des Sciences Biologiques de l'UQÀM et plus particulièrement Louis-Charles Levros et Philippe Legault pour leurs précieuses aides.

Ce travail n'aurait jamais pu voir le jour sans le soutien inconditionnel de tous les membres de ma famille, en particulier mon père et ma mère.

TABLE DES MATIÈRES	Pages
LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABBRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I : INTRODUCTION	1
LA LIPOGENÈSE HÉPATIQUE.....	3
1.1. La lipogenèse.....	4
1.2. Régulation de la lipogenèse.....	5
1.2.1. Régulation nutritionnelle.....	5
1.2.2. Régulation hormonale.....	6
LA STÉAROYL CoA DÉSATURASE 1.....	8
2.1. Présentation de la SCD1.....	9
2.1.1. Rôle de SCD1.....	9
2.1.2. Rôle dans l'obésité.....	10
2.2. Régulation de la SCD1.....	10
2.2.1. Régulation nutritionnelle.....	11
2.2.2. Régulation hormonale.....	12
RÔLE DE L'INSULINE SUR LA TRANSCRIPTION.....	14
3.1. Régulation négative par l'insuline.....	16
3.1.1. PEPCK.....	16
3.1.2. IGFBP-1.....	18
3.2. Régulation positive par l'insuline.....	19
3.2.1. FAS.....	19
3.2.2. EM.....	20
VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE.....	22
CHAPITRE II : OBJECTIFS DE L'ÉTUDE	26
1. Localisation de l'élément de réponse à l'insuline.....	27
2. Identification des facteurs de transcription.....	27
CHAPITRE III : MÉTHODOLOGIE.....	28

Préparation des plasmides contenant le promoteur SCD1.....	29
1.1. Coupures par enzymes de restriction.....	29
1.2. Purification de l'ADN et ligation.....	29
1.3. Transformation bactérienne.....	29
1.4. Préparation d'ADN et vérification du clonage.....	30
1.5. Maxi-préparation d'ADN par la technique de CsCl.....	30
2. Culture cellulaire.....	31
2.1. Préparation des CEH.....	31
2.2. Culture des cellules HepG2.....	32
2.3. Transfection.....	32
2.3.1. CEH.....	32
2.3.2. HepG2.....	33
2.4. Lyses cellulaires et essais biochimiques.....	33
2.4.1. Essai luciférase.....	33
2.4.2. Essai β -galactosidase.....	34
2.4.3. Dosage protéique.....	34
2.4.4. Détermination de l'activité luciférase standardisée.....	34
3. Retards sur gel.....	35
3.1. Choix des amorces.....	35
3.2. Préparation d'extraits nucléaires.....	35
3.3. Marquage des oligonucléotides.....	36
3.4. Compétitions spécifiques et mutation.....	37
3.5. Analyse par SuperShift.....	38
3.6. Révélation.....	38
CHAPITRE IV : RÉSULTATS.....	39
1. Activité luciférase des constructions SCD1-1 à SCD1-6.....	40
2. Caractérisation de l'élément de réponse à l'insuline dans le promoteur SCD1.....	41
3. Choix des amorces et les retards sur gel.....	45
4. Compétitions spécifiques et mutation.....	47
5. Analyse par SuperShift.....	49
6. Préparation de la construction SCD1-7 et mesure de l'activité luciférase.....	51
CHAPITRE V : DISCUSSION.....	55
CHAPITRE VI : CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	62
BIBLIOGRAPHIE.....	66

LISTE DES FIGURES

Figures		Pages
1	Schéma de la lipogenèse de novo (LDN) hépatique présentant les différents précurseurs des acides gras ainsi que les enzymes impliquées.....	4
2	Rôle des stéaroyl-CoA désaturases dans la lipogenèse de novo.....	9
3	Schéma des promoteurs des gènes PEPCCK et IGFBP1.....	18
4	Schéma des promoteurs des gènes FAS (A) et ME (B).....	21
5	Principales voies de signalisation par l'insuline.....	25
6	Mesure de l'activité luciférase sur les différentes constructions du promoteur du gène aviaire SCD1 (SCD1-1 à SCD1-6) dans des CEH en présence de 50 nM d'insuline.....	40
7	Séquence totale du promoteur du gène aviaire de SCD1.....	43
8	Séquence et analyse informatique de la délétion SCD1-6 et les différents sites putatifs de fixation des facteurs de transcription.....	44
9	Choix des sondes pour l'analyse de retard sur gel.....	45
10	Analyse de retard sur gel sur les 4 sondes synthétisées au niveau du promoteur de SCD1 en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50 nM d'insuline	46
11	Expériences de compétitions spécifiques réalisées sur les sondes 1 et 2 en d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50 nM d'insuline	48
12	Expériences de retard sur gel réalisées sur les sondes 1 et 2 mutées ou non en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50 nM d'insuline	49
13	Expériences de supershift réalisées sur les sondes 1 et 2 en présence d'anticorps spécifiques anti-SREBP-1 et anti-NF-Y en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50 nM d'insuline.....	50
14	Représentation schématique du vecteur pGL2 basic avec les inserts SCD1-6 et SCD1-7 et les différents sites d'enzymes de restriction utilisées lors du clonage.....	52
15	Gels d'agarose (1%) effectués lors du clonage de la construction SCD1-7...	53
16	Mesures des activités luciférases effectuées sur les délétions SCD1-1, SCD1-6 et SCD1-7 après stimulation par 50 nM d'insuline	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableaux		Pages
I	Facteurs nutritionnels, hormonaux et environnementaux régulant l'expression des Stéaroyl-CoA désaturases.....	13
II	Différents gènes régulés transcriptionnellement par l'insuline et les facteurs de transcription impliqués dans leur régulation.....	16
III	Analyse informatique de la séquence du promoteur de SCD1 avec les différents facteurs de transcription se fixant sur cette séquence.....	43

LISTE DES ABRÉVIATIONS

4EBP-1	<i>eIF4E-binding protein 1</i>
ACC	acétyl-CoA carboxylase
ADN	acide désoxyribonucleique
Akt	protéine kinase B
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	kinases AMP-dépendantes
ARNm	ARN messenger
ATF2	activating transcription factor-2
BSA	bovine serum albumine
C/EBP	<i>CCAAT-box/Enhancer Binding Protein</i>
CEH	hépatocyte embryonnaire de poulet
ChoRE	<i>carbohydrate response element</i>
ChREBP	carbohydrate responsive element binding protein
CPT-1	carnitine parmitoyl transférase 1
DBD	DNA binding domain
Erk1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
EM	enzyme malique
FAS	fatty acid synthase
Foxo	<i>forkhead-related protein</i>
GH	growth hormone
GK	glucokinase
GLUT4	transporteur de glucose-4
GR	glucocorticoid receptor
IGFBP-1	<i>insulin growth factor binding protein 1</i>
IRE	élément de réponse à l'insuline
IR	récepteur à insuline
IRS	<i>insulin receptor substrate</i>
kDa	kilodalton
Kb	kilo paire de bases
LDN	lipogenèse <i>de novo</i>
LMH	Leghorn male hepatoma cells
LPK	liver pyruvate kinase
LXR	liver X factor receptor
LXRE	liver X response element
MCD	malonyl-CoA décarboxylase
MCFA	medium chain fatty acids
mTOR	mammalian target of rapamycin
MUFA	acide gras monoinsaturé
NADPH	déhydronicotinamide adénine dinucléotide phosphate
N-CoR	co-répresseur de récepteurs nucléaires
NF-Y	<i>nuclear factor Y</i>
Pb	paire de bases
PI3-kinase	phosphatidyl inositol-3 kinase

PKA	protéine kinase A
PPAR	peroxysome proliferator activator receptor
PUFA	polyunsaturated fatty acids
RAR	retinoic acid receptor
RXR	retinoic X receptor
S6K	<i>p70 ribosomal S6 kinase</i>
SCD	stearoyl-CoA desaturase
SRE	élément de réponse aux stérols
SREBP-1	sterol responsive element binding protein-1
Sp1	<i>specificity protein 1</i>
T3	triiodothyronine
TF	facteur de transcription
TH	thyroid hormones
TR	thyroid hormone receptor
UBF	<i>upstream binding factor</i>
UCP2	<i>uncoupling protein 2</i>
USF	<i>upstream stimulatory factor</i>

RÉSUMÉ

La Stéaroyl-CoA Désaturase 1 (SCD-1) est une enzyme hépatique impliquée dans la synthèse des acides gras monoinsaturés. Une forte activité de l'enzyme SCD-1 ainsi qu'une altération du ratio acides gras saturés : insaturés est retrouvée dans diverses pathologies telles que l'obésité, le diabète de type II et le cancer. Principalement transcriptionnelle, la régulation de SCD-1 est sous le contrôle de divers facteurs nutritionnels (ex: glucose) et hormonaux (ex: insuline). L'étude tente ici de localiser l'élément de réponse à l'insuline au niveau du promoteur du gène de la SCD-1 et d'identifier les facteurs de transcriptions spécifiques qui s'y fixent. Pour cela, des hépatocytes embryonnaires de poulets (CEH) sont transfectés avec différentes constructions contenant des délétions du promoteur du gène aviaire SCD-1 (délétions SCD1-1 à SCD1-6) clonées en amont du gène rapporteur de la luciférase (*pGL2 basic vector*). La mesure de l'activité luciférase après stimulation par l'insuline a permis de distinguer deux éléments de réponse au niveau du promoteur du gène SCD1. L'analyse des séquences consensus de ces éléments a permis de déterminer différents facteurs de transcription (ex: SRE, NF-Y, USF et Sp1) pouvant médier la régulation transcriptionnelle du gène par l'insuline. Des amorces spécifiques ciblant les régions consensus de l'élément le plus en 3' ainsi que la technique de retard sur gel en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par l'insuline, ont permis de vérifier que les séquences contenant les sites de fixation de SREBP-1 et NF-Y fixent ces facteurs de transcription seulement en présence d'insuline. L'utilisation d'anticorps spécifiques dirigés contre ces protéines et la perte de l'activité luciférase après transfection de construction dépourvue de ces mêmes régions (délétion SCD1-7) après stimulation par l'insuline ont permis de confirmer l'implication des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y dans cette régulation.

Mots clés : lipogenèse de novo, stéaroyl-CoA désaturase 1, foie, insuline, facteurs de transcription, SREBP-1, NF-Y.

CHAPITRE I

INTRODUCTION

L'obésité est devenue un problème de santé majeur dans notre société. En effet, environ 1,6 milliard d'individus dans le monde ont une surcharge corporelle et parmi eux 400 millions sont considérés comme cliniquement obèses (*Organisation Mondiale de la Santé 2005*). D'après la même source, d'ici 2015, le nombre d'individus ayant un surpoids pourrait augmenter jusqu'à 2,3 milliards et les obèses jusqu'à 700 millions. L'obésité est considérée aujourd'hui comme une maladie à part entière qui touche plus de 35 % de la population de l'Amérique du nord et elle est souvent associée à de nombreuses pathologies comme l'hypertension artérielle, le diabète de type II, le développement de maladies cardio-vasculaires et certains cancers. De plus, ce problème devient de plus en plus fréquent chez les jeunes. Il est donc devenu nécessaire de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de ce dérèglement métabolique afin de pouvoir lutter contre ce fléau.

La stéaroyl CoA désaturase 1 (SCD1) est une enzyme qui joue un rôle important dans le développement de l'obésité. C'est une enzyme intervenant dans la biosynthèse des acides gras monoinsaturés (tels que l'acide oléique et l'acide palmitique) à partir d'acides gras saturés (le palmitate et le stéarate). Ceci se passe principalement au niveau du foie chez l'homme comme chez le poulet (*Lefevre 2001*). Une modification du rapport « acides gras saturés sur acides gras monoinsaturés » affecte la composition des phospholipides membranaires induisant l'apparition de l'obésité ainsi que d'autres maladies tel que le cancer et le diabète de type II (*Kang, Miyazaki et al. 2004*).

Pour comprendre le développement de ces dérèglements métaboliques, il faut tout d'abord comprendre les mécanismes de régulation du gène SCD1. Des études préalables ont en effet démontré que ce gène est soumis à de nombreuses régulations aussi bien nutritionnelles qu'hormonales. Par exemple, l'insuline stimule la transcription du gène SCD1 alors que la leptine l'inhibe (*Ntambi and Miyazaki 2004*). De plus, il a été démontré que cette régulation hormonale se déroule essentiellement au niveau transcriptionnel.

LA LIPOGENÈSE HÉPATIQUE

1.1 La lipogénèse

La lipogénèse est l'ensemble des voies métaboliques impliquées dans la formation de triglycérides et d'acides gras à partir de nutriments cellulaires. Ceci se passe essentiellement au niveau du foie. (Figure 1)

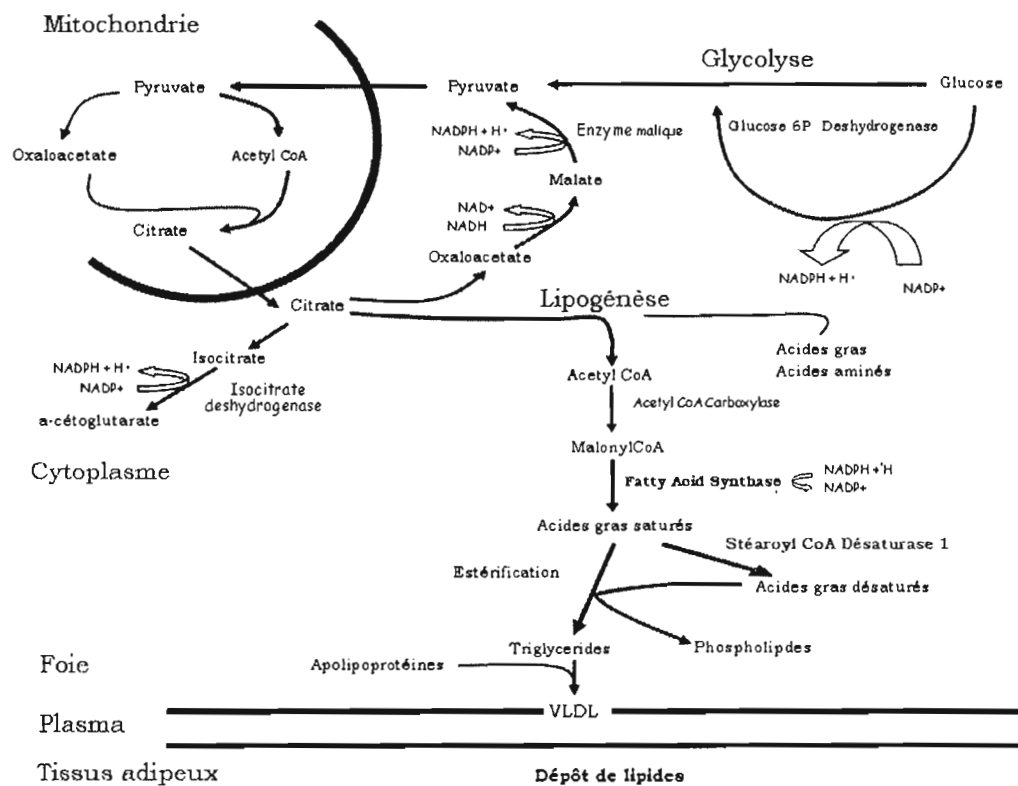


Figure 1 : Schéma de la lipogénèse *de novo* hépatique présentant les différents précurseurs des acides gras ainsi que les enzymes impliquées.

La synthèse lipidique *de novo* est la biosynthèse d'acides gras effectuée à partir d'une source de carbone telle que les glucides, les acides aminés ou d'autres acides gras, la nature des précurseurs variant selon le régime et l'espèce (Vernon, Barber et al. 1999). Ce phénomène survient lorsque l'emmagasiner d'énergie sous forme de glycogène n'est plus possible et que la capacité d'oxydation est dépassée : l'excès de glucides est alors converti en acides gras par la lipogénèse (Schwarz, Linfoot et al.

2003). Ceci se passe essentiellement dans le foie chez les hommes comme chez les poulets, bien que quelques études soulignent une contribution limitée d'autres tissus comme le tissu adipeux (*Lefevre 1999; Diraison, Yankah et al. 2003*). Par la suite, les acides gras seront estérifiés pour former des phospholipides ou des triglycérides qui adjoindront des protéines de transport ou lipoprotéines, pour être envoyés dans la circulation sous forme de VLDL, permettant un stockage au niveau adipocytaire. Les principales enzymes de la lipogenèse *de novo* (LDN) sont l'acétyl-CoA carboxylase (ACC), l'acide gras synthase (FAS), l'enzyme malique (EM), la stéaroyl-CoA désaturase 1 (SCD1) et les élongases (*Voet and Voet 1998*). La première étape d'engagement de la synthèse d'acides gras est une réaction à vitesse limitante où l'ACC catalyse la carboxylation de l'acétyl-CoA qui se transforme en malonyl-CoA. Cette enzyme est régulée par deux mécanismes : sa forme (active en polymère et inactive en protomère) et son état de phosphorylation (activée par déphosphorylation insulino-dépendante et inactivée après phosphorylation par l'AMP Kinase).

1.2 La régulation de la lipogenèse

1.2.1 La régulation nutritionnelle

L'alimentation joue un rôle important dans la régulation de la lipogenèse. En effet, un régime riche en glucides et faible en graisses mène à l'augmentation de la LDN et ceci est vrai chez le poulet comme chez l'homme (*Leveille, Romsos et al. 1975; Diraison, Yankah et al. 2003*). Par ailleurs, on a remarqué que le taux de LDN chez les poulets réalimentés par une diète riche en glucides après une nuit de jeun augmente fortement, alors qu'il est diminué de 90% après une nuit de jeun (*Leveille, Romsos et al. 1975*). Ceci peut être expliqué par le fait que la consommation d'une telle diète mène à l'augmentation de la transcription de plus d'une douzaine d'enzymes impliquées dans la conversion du glucose en acides gras (comme l'ACC, la FAS, la SCD1, l'EM ou la LPK (liver pyruvate kinase)) (*Ishii, Iizuka et al. 2004*), alors que le jeûne diminue la transcription de ces mêmes gènes (*Roncero and Goodridge 1992*).

Ainsi, à eux seuls, les nutriments peuvent influencer la LDN. Par exemple, le glucose active un facteur de transcription nommé ChREBP (carbohydre responsive

element binding protein), lequel stimule la transcription des gènes (LPK, ACC) possédant une séquence ChoRE (carbohydrate response element) (*Dentin, Pegorier et al. 2004*). À l'inverse, les acides gras polyinsaturés (PUFAs) inhibent la transcription d'autres gènes (FAS, SCD1) en empêchant l'action du facteur de transcription SREBP-1 (*Sekiya, Yahagi et al. 2003*) ou en se fixant directement sur un élément de réponse associé aux PUFAs (PUFA-RE) (*Moon, Latasa et al. 2002*). D'autres acides gras tels que l'hexanoate et l'octanoate, acides gras à chaînes moyennes, inhibent aussi la stimulation des gènes FAS et ME stimulés par l'insuline et la T3 (*Roncero and Goodridge 1992*).

Cependant les facteurs nutritionnels ne sont pas seuls à intervenir dans la régulation des gènes de la LDN. En fait, ils sont aussi liés à des facteurs hormonaux. En effet, lors d'un jeun, la concentration du glucagon plasmatique est très élevée entraînant une diminution de la LDN, alors qu'une élévation du taux de glucose plasmatique conduit à une élévation d'insuline (*Ma, Tsatsos et al. 2005*). Cependant, des études *in vitro* ont montré que certains composants de la diète régulent la LDN indépendamment de ces hormones (*Dentin, Pegorier et al. 2004*). En effet, certains gènes de la lipogenèse nécessitent la complémentarité des hormones et de la nutrition pour atteindre un taux optimal de transcription (comme ACC, SCD1), alors que d'autres gènes n'ont besoin que de l'insuline (GK, SREBP-1c) (*Coffy, Decaux et al. 2005*) ou de glucose (LPK) (*Shimano 1999*).

1.2.2 La régulation hormonale

La régulation hormonale de la lipogenèse se fait essentiellement par l'insuline, la T3, la leptine et le glucagon. L'insuline est une hormone pancréatique qui a comme effet de stocker l'énergie sous forme de glycogène ou d'acides gras en diminuant leur oxydation. Elle favorise aussi l'entrée du glucose dans le muscle, active la glycolyse qui fournit le pyruvate qui sera converti en acétyl-CoA précurseur nécessaire à la synthèse de *novo* des acides gras, ainsi que le glycérol 3 phosphate nécessaire à la formation des triglycérides. Plusieurs effets de l'insuline sont le résultat de la modulation transcriptionnelle de plusieurs gènes et ceci se fait en modulant l'action de différents facteurs de transcription dont les FKHR (forkhead-related protein), impliqués

dans l'inhibition de certains gènes hépatiques comme la PEPCK (phosphoenolpyruvate carboxykinase) et les SREBPs, principales molécules activées qui induisent la transcription des gènes glycolytiques et lipogéniques impliqués dans la synthèse du cholestérol tout en inhibant les gènes de la gluconéogenèse (Mounier and Posner 2006).

Comme l'insuline, la concentration plasmatique de l'hormone thyroïdienne triiodothyronine (T3) est fortement augmentée après un repas. Le foie est une cible majeure de la T3 (*Feng, Jiang et al. 2000*). Les hépatocytes possèdent en effet des récepteurs à cette hormone appelés les TRs (triiodothyronine receptors) qui, lors de la liaison à la T3, forment un complexe internalisé activant la transcription des gènes tels que ceux de la FAS et de l'EM.

La leptine est une hormone adipocytaire peu connue. Ses effets sur la transcription de gènes tendent vers l'augmentation de l'oxydation des acides gras (UCP2) et la diminution de la LDN (SCD1, ME, GK). Elle est reconnue pour augmenter les effets insuliniques dans la plupart des tissus, raison pour laquelle certains la voient comme une option dans le traitement de la résistance à l'insuline. En outre, la leptine provoque une réduction de la prise alimentaire (en jouant sur les sensations de faim et satiété contrôlées par l'hypothalamus), une augmentation de la thermogenèse et du métabolisme basal.

Le glucagon, hormone pancréatique, est un agoniste des actions insuliniques sur plusieurs voies métaboliques hépatiques. Il agit via le second messenger AMPc et l'activation de la protéine kinase A (PKA). Ainsi, le glucagon diminue l'expression de SREBP-1c et stimule la transcription du gène PEPCK, inhibant les gènes FAS et EM par la T3 (*Foretz, Guichard et al. 1999; Foulle 2002*).

LA STÉAROYL CoA DÉSATURASE 1

2.1 Présentation de la Stéaroyl CoA désaturase 1 (SCD1)

2.1.1 Rôle de SCD1

La Stéaroyl CoA désaturase 1 (SCD1) est une enzyme intervenant dans la biosynthèse des acides gras monoinsaturés à partir des acides gras saturés. Elle permet la formation d'une double liaison en position *cis* au niveau du carbone 9 de l'acide palmitique (C16:0) et de l'acide stéarique (C18:0) qui vont donner respectivement de l'acide palmitoléique (16:1) et de l'acide oléique (18:1) (Ntambi 1999). (Figure 2)

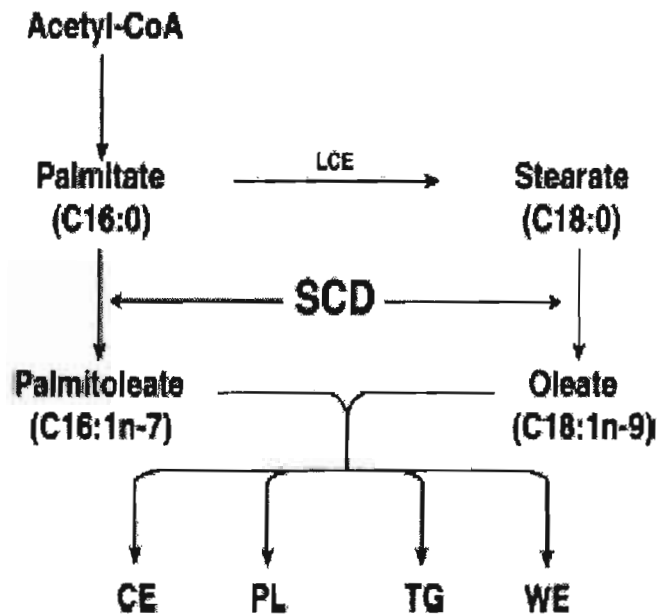


Figure 2 : Rôle des stéaroyl-CoA désaturases dans la lipogenèse *de novo* menant à la production de palmitoléate et d'oléate, lesquels entrent dans la composition des esters de cholestérol (CE), des phospholipides (PL), des triglycérides (TG) et des esters de cire (WE) (Ntambi et Miyazaki, 2004).

Donc, la SCD1 affecte la composition des phospholipides et des triglycérides en acides gras. Les effets sur la composition phospholipidique sont importants dans le maintien de la fluidité membranaire et l'altération de cette composition est impliquée dans plusieurs maladies. Par exemple, une diminution de la saturation lipidique est observée dans de nombreux carcinomes qui sembleraient être corrélée à l'augmentation

de l'expression de SCD1 (*Khoo 1991; Li 1994*). De plus, une modulation de l'activité de SCD-1 inhiberait la réplication de l'ARN viral du virus de l'hépatite C démontrant l'importance de la fluidité membranaire et donc du niveau de désaturation des acides gras dans l'infection virale (*Lee 2001*).

2.1.2 Rôle dans l'obésité

Plusieurs études ont démontré que l'activité de SCD1 est augmentée chez les patients obèses et dans des modèles d'animaux obèses (*Enser 1974; Jones 1996*). Récemment, une étude effectuée sur des souris ob/ob (souris de phénotype obèse qui possèdent une mutation au niveau du récepteur de la leptine) a démontré que SCD1 jouait un rôle important dans la perte de poids régulée par la leptine (*Cohen 2002*). Une mutation au niveau du gène SCD1 réduisant le niveau d'expression de l'enzyme chez ces souris les rend moins sujettes à la prise de poids en réponse à un régime riche en sucre et augmente leurs dépenses énergétiques. La même corrélation entre l'expression de SCD1 et l'obésité a été observée chez les souris normales. Chez des souris ayant un taux élevé de SCD1, on a pu observer une diminution du poids corporel, une augmentation de la sensibilité à l'insuline et une résistance aux alimentations induisant des gains de poids (*Ntambi 2002*). De plus, des expériences réalisées sur des poulets maigres et gras sélectionnés de façon divergente sur le niveau de tissus adipeux abdominaux ont démontré une augmentation significative du niveau d'ARNm (*Diot 2000*) et d'activité de l'enzyme SCD1 chez les poulets gras en comparaison avec les maigres (*Legrand 1992*). Toutes ces études démontrent le rôle important que jouerait SCD1 dans l'obésité.

2.2 Régulation de la SCD1

SCD1 est une protéine membranaire de 40 kDa ancrée dans le réticulum endoplasmique (*Ozols 1997*). La totalité de la séquence codante y compris la région promotrice du gène SCD1 a été clonée chez différentes espèces comme chez la souris, le rat et le poulet (*Thiede 1985; Ntambi 1988; Diot 2000*). La répartition tissulaire et l'altération alimentaire de l'ARNm de SCD1 ont été analysées chez ces espèces. Chez

les rongeurs, le gène SCD1 est exprimé dans les tissus adipeux et le foie mais seulement en réponse à une alimentation riche en glucides au niveau hépatique (*Ntambi 1988; Ntambi 1992*). Des études effectuées sur les rongeurs et chez le poulet démontrent que cet effet de la diète sur l'expression du gène SCD1 est régulé à la fois par l'insuline et les glucides (*Ntambi 1992*). Les proliférateurs de peroxisomes (PPAR) et le cholestérol sont aussi reconnus comme des effecteurs positifs de l'expression du gène de SCD1 (*Joshi 1979; Chin 1982; Kawashima 1983*) alors que les acides gras polyinsaturés et la leptine en sont les inhibiteurs (*Ntambi 1999; Lefevre 2001; Cohen 2002*).

L'analyse informatique des séquences promotrices du gène SCD1 chez la souris, l'humain et le poulet montre une grande conservation. Toutes ces séquences contiennent des éléments de fixation pour la liaison de facteurs de transcription tels que SREBP (sterol regulatory element binding protein), NF-Y (nuclear factor Y), C/EBP α (CCAAT enhancer binding protein alpha), NF-1 (nuclear factor 1) et USF (upStream transcription factor). La plupart de ces facteurs seraient impliqués dans la régulation nutritionnelle et hormonale de la transcription du gène SCD1 (*Christy 1989; Lefevre 2001; Zhang 2001*). SREBP et NF-Y sont reconnus pour leur implication dans la régulation du gène SCD1 par les PUFAs alors que Sp1/USF joue un rôle dans la régulation des gènes FAS, ATP-citrate lyase et leptine par l'insuline. La présence de séquences de régulation similaires laisse penser à un mécanisme de régulation commun entre ces espèces.

2.2.1 Régulation nutritionnelle

Suite à une alimentation riche en glucides et faible en lipides, on constate une augmentation importante du taux d'ARNm hépatique de SCD1 par comparaison à une alimentation normale (*Lefevre 2001*). Une telle diète augmente aussi la concentration de l'enzyme SCD1 et son activité enzymatique d'environ 50 fois dans le foie, suggérant plusieurs niveaux de régulation (*Heinemann and Ozols 2003*).

Le fructose possède un effet davantage lipogénique que le glucose (*Miyazaki, Dobrzyn et al. 2004*). Le fructose et le glucose induisent une augmentation respective de 45 et 46 fois le taux d'ARNm de SCD1 suite à une stimulation par l'insuline

(Waters 1994).

De leur côté, les PUFA inhibent SCD1 par des mécanismes SREBP dépendants et SREBP indépendants. En fait, ils diminuent la transcription et la maturation des SREBP donc diminuent leur liaison aux éléments de réponse SRE inhibant ainsi la transcription de SCD1 par ces facteurs (Ntambi 1999). De plus, ils peuvent réprimer la transcription de SCD1 en se liant directement à leur propre site de liaison PUFA-RE (polyunsaturated fatty acids response element). Les PUFA pourraient aussi jouer un rôle post-transcriptionnel en diminuant la stabilité de l'ARNm de SCD1.

Le cholestérol pour sa part, est reconnu pour activer la transcription du gène SCD1 par modulation de l'expression du récepteur LXR α (Ntambi 1999) dont l'activation peut mener à la maturation de SREBP et donc à une augmentation de la disponibilité de la forme mature nucléaire du facteur de transcription (Eberle, Hegarty et al. 2004).

2.2.2 Régulation hormonale

L'insuline augmente l'activité enzymatique de SCD1 et le taux d'ARNm respectivement de 3 et de 1,4 fois (Lefevre 1999). Cette hormone ne semble pas avoir d'effet sur la stabilité de l'ARNm. Les mécanismes précis de l'action de l'insuline sur le gène SCD1 ne sont pas encore connus et c'est ce que l'on se propose de déterminer dans cette étude.

Pour la T3, les mécanismes d'action et l'élément de réponse sont déjà connus. On a constaté qu'elle avait un effet contradictoire. En effet, elle mène à l'activation de plusieurs gènes de la lipogenèse et, en même temps, elle inhibe SCD1 par l'intermédiaire du TR (Waters, Miller et al. 1997).

La leptine est une hormone sécrétée par les adipocytes qui régule la balance énergétique, le métabolisme et les réponses neuroendocriniennes qui affectent l'appétit (Zhang 1994). Des études ont démontré qu'une injection de certaines doses de leptine chez des souris ob/ob fait diminuer leur obésité. Il a été aussi démontré que des souris sans récepteurs à la leptine au niveau de l'hypothalamus développent un « foie gras » (caractéristique d'une forte activité SCD1), alors que des souris avec un récepteur à leptine au niveau du foie conservent un foie d'apparence normale. La leptine module

aussi la production des acides gras monoinsaturés dans des tissus autres que le foie. Son effet inhibiteur sur l'activité enzymatique de SCD1 dans des tissus comme le cerveau pourrait contribuer à certains de ces effets métaboliques observés sur l'appétit (*Ntambi and Miyazaki 2004*). Cependant, les mécanismes d'action de la leptine ne sont pas encore connus.

Le glucagon pour sa part, est considéré comme un répresseur de la transcription du gène SCD1. En effet, en plus de son effet inhibiteur direct par la diminution de l'activité enzymatique et la concentration d'ARNm de SCD1, il agit aussi comme inhibiteur de l'action de l'insuline (*Spence and Pitot 1982; Lefevre 1999*).

Tableau I : Facteurs nutritionnels, hormonaux et environnementaux régulant l'expression des Stéaroyl-CoA désaturases (*Ntambi et Miyazaki, 2004*).

Dietary factors	Hormones	Other
▲ Glucose [51,52]	▲ Insulin [51]	▲ Peroxisome [60]
▲ Fructose A [52]	▲ Growth hormone [103,104]	▲ Temperature [56,57]
▲ Vitamin A [55,61,62]	▲ Estrogen [105]	▲ Iron [109]
▲ Cholesterol [53-55]	▲ Androgen [25,106]	▲ Liver-X-receptor agonist [55,59,60]
▲ Vitamin D[100]	▼ Leptin [24]	▲ TGF- β [110]
▼ Polyunsaturated fatty acids [42,63]	▼ Glucagon [107]	▲ Light [58]
▲▼ Alcohol [101,102]	▼ Thyroid hormone [68]	▲ β -Amyloid [111]
▲▼ Conjugated linoleic acid [64,65]	▲▼ Dehydroepiandrosterone [70,108]	▼ Thiazolidinediones [69,112]
		▼ Cadmium [113]
		▼ TNF- α [114]

RÔLE DE L'INSULINE SUR LA TRANSCRIPTION

L'insuline régule plusieurs processus cellulaires comme le transport du glucose, la synthèse de glycogène, la prolifération cellulaire et la transcription des gènes (*Khan 1989; Ish-Shalom, Christoffersen et al. 1997; Srivastava and Pandey 1998*). La régulation transcriptionnelle est l'un des effets les plus importants de l'insuline. Il est connu aujourd'hui que cette hormone régule l'expression de plus de 150 gènes (**Tableau II**). Par exemple, il a été clairement démontré que l'insuline régule négativement l'expression du gène PEPCK (*Shrago, Lardy et al. 1963*) et qu'elle augmente l'expression de FAS chez les animaux diabétiques réalimentés (*Lakshmanan, Nepokroeff et al. 1972; Paulauskis and Sul 1989*).

Parmi les gènes qui sont contrôlés négativement par l'insuline, on retrouve ceux qui ont pour fonction l'homéostasie du glucose tels que le gène PEPCK, la Glucose 6-phosphatase (G6-Pase), la tyrosine amino transférase (TAT) et ceux qui contrôlent le métabolisme du cholestérol comme la cholestérol 7 alpha-hydroxylase (CYP7) et le gène de la stérol 12 alpha-hydroxylase (CYP8B1). Pour les gènes qui sont régulés positivement par l'insuline, il y a ceux qui interviennent dans la synthèse lipidique (FAS, Acétyl CoA Carboxylase, SCD1) et d'autres qui codent pour des enzymes impliqués dans le métabolisme du glucose (GAPDH, glucokinase, hexokinase II,...) ou encore pour le transport du glucose (famille des GLUT) (*Mounier and Posner 2006*).

Tableau II : Différents gènes régulés transcriptionnellement par l'insuline et les facteurs de transcription impliqués dans leur régulation. (Mounier et Posner, 2006).

Genes	Function	Transcription factors	References
<i>Acetyl CoA carboxylase</i>	Lipogenesis	SREBP-1c	[Magana, 1997]
<i>Fatty acid synthase</i>	Lipogenesis	SREBP1 & 2, USF, Sp1	[Porstmann, 2005] [Griffin, 2004] [Fukuda, 1999]
<i>Stearoyl CoA desaturase</i>	Lipogenesis	SREBP1-c & unknown	[Tabor, 1999]
<i>ATP-citrate lyase</i>	Lipogenesis	Sp1 & Sp3	[Fukuda, 1999]
<i>SREBP1-c</i>	Transcription factor	LXRs	[Chen, 2004]
<i>c-fos</i>	Transcription factor	Elk-1	[Xi, 1997]
<i>Hexokinase II</i>	Glycolysis	SREBP-1c	[Gosmain, 2004]
<i>Leptin</i>	Hormonal	Sp1	[Fukuda, 1999]
<i>Insulin</i>	Hormonal	PDX1	[Wu, 1999]
<i>Apolipoprotein AI</i>	Lipid transport	Sp1	[Lam, 2003]
<i>LDL receptor</i>	Lipid transport	Sp1 & SREBP-1a	[Sekar, 2004]
<i>Insulin receptor</i>	Insulin signaling	Sp1 & Sp3	[Fukuda, 2001]
<i>Calmodulin</i>	Calcium signaling	Sp1	[Majumdar, 2003]
<i>Microsomal triglyceride transfer protein (MTP)</i>	Lipid metabolism	SREBPs	[Au, 2003] [Sato, 1999]
<i>Phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK)</i>	Rate-limiting gluconeogenic enzyme	Foxo1; c/EBP β ;SREBP-1c and Sp1	[Hall, 2000] [Duong, 2002] [Chakravarty, 2004]

3.1 Régulation négative par l'insuline

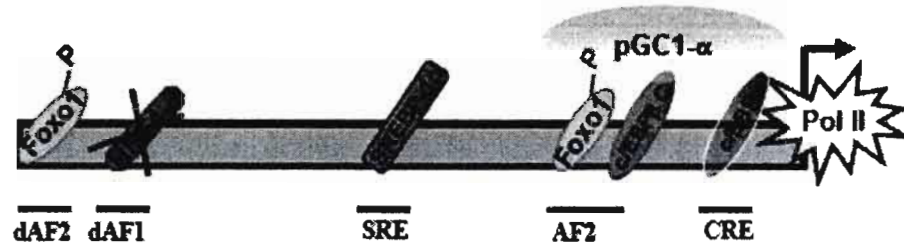
La transcription des gènes hépatiques PEPCK et IGFBP-1 est stimulée par les glucocorticoïdes et l'AMPc et inhibée par l'insuline. L'effet de l'insuline domine la transcription génique de PEPCK et de IGFBP-1 même en présence de glucocorticoïdes et d'AMPc (Hall, Yamasaki et al. 2000). Bien qu'il y ait des similitudes au niveau de la régulation de ces deux gènes, il existe quand même des différences notables.

3.1.1 PEPCK

Dans le promoteur de PEPCK, plusieurs IRE (Insulin Response Element) ont été identifiés et sont essentiels à l'effet insulinique sur la transcription du gène en présence et en absence de glucocorticoïdes et d'AMPc (Chakravarty, Hanson et al. 2005). Il y a au moins 5 IRE caractérisés dans le promoteur PEPCK (**Figure 3.A**). Après les traitements par l'AMPc et les glucocorticoïdes, il y a une augmentation de la liaison de

c/EBP α et de c/EBP β au CRE (cAMP Response Element) en amont du site d'initiation de la transcription (*Jurado, Song et al. 2002*). L'insuline provoque alors une abolition totale de la fixation des c/EBP (*Chakravarty, Hanson et al. 2005*). Il existe d'autres IREs comme AF2, dAF1 et dAF2 (*Imai, Stromstedt et al. 1990*). AF2 fixe les facteurs de transcription tel que GR (*Imai, Miner et al. 1993*), Foxo1 (*Puigserver, Rhee et al. 2003*), PPAR α , c/EBP α et c/EBP β (*Croniger, Leahy et al. 1998*), dAF1HNF-4 α (*Hall, Yamasaki et al. 2000*) et dAF2 Foxo1. En plus, PGC-1 α et d'autres co-activateurs sont impliqués dans la coordination de la transcription du gène en communiquant avec le complexe de transcription de base (*Yoon, Puigserver et al. 2001*). Après traitement à l'insuline, les protéines Foxo1 sont phosphorylées ce qui induit leur décrochage de l'ADN et leur exportation vers le cytosol où elles sont par association avec la protéine d'ancrage « 14-3-3 » (*Biggs, Meisenhelder et al. 1999; Brunet, Bonni et al. 1999; Takaishi, Konishi et al. 1999*). La stimulation de la phosphorylation de Foxo1 par l'insuline désorganise aussi les liaisons avec le co-activateur PGC-1 α (*Yoon, Puigserver et al. 2001*). L'insuline entraîne aussi une abolition de la liaison de HNF-4 α au site dAF1 (*Yamamoto, Shimano et al. 2004*) et une modification du taux des isoformes de c/EBP β , ce qui provoque une augmentation de la concentration de l'isoforme C qui serait responsable de l'inhibition transcriptionnelle (*Duong, Waltner-Law et al. 2002*). Récemment, il a été démontré la présence d'un SRE liant Sp1 en absence d'insuline résultant en l'activation de la transcription du gène PEPCK. Après traitement à l'insuline, SREBP1c se fixerait sur le site SRE déplaçant ainsi Sp1 et diminuant la transcription de PEPCK (*Chakravarty, Hanson et al. 2005*).

A: Insulin target sequences in PEPCK promoter



B: Insulin target sequences in IGFBP-1 promoter

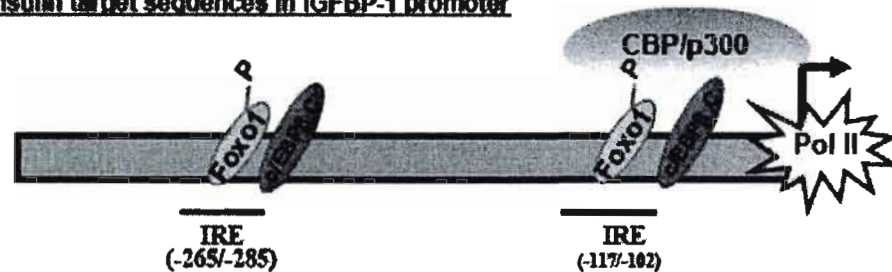


Figure 3: Schéma des promoteurs des gènes PEPCK et IGFBP1

Le schéma montre les différentes régions du promoteur impliquées dans la régulation de la transcription du gène par l'insuline. **A.** dAF2 : *facteur distal 2*, dAF1 : *facteur distal 1*, SRE : *sterol regulatory element*, AF2 : *facteur accessoire 2*, CRE : *cAMP response element* HNF-4α: *hepatic nuclear factor 4α*, SREBP: *sterol regulatory element binding protein*, c/EBP: *CAAT/enhancer binding protein*, PGC-1α: *peroxisome proliferator-activated receptor coactivator 1α*. Pol II: *RNA polymerase II*. **B.** IRE: *insulin response element*. c/EBP: *CAAT/enhance binding protein*, CBP/p300: *CREB binding protein/p300*. Pol II: *RNA polymerase II*. (Mounier C. et Posner BI., 2006)

3.1.2 IGFBP-1

Bien qu'il n'y a pas beaucoup d'études qui ont examiné la régulation du gène de IGFBP-1, deux IRE ont été identifiés au niveau du promoteur de ce gène (**Figure 3.B**). Le premier est un domaine de 100 pb riche en AT (Goswami, Lacson et al. 1994) qui est nécessaire à l'induction maximale de la transcription du gène IGFBP-1 par les glucocorticoïdes et à son inhibition par l'insuline (Suwanichkul, Allander et al. 1994). Les glucocorticoïdes induisent la liaison d'un complexe de facteurs de transcription incluant Foxo1, c/EBP β et le co-activateur CBP/p300 au niveau de ce site (Cichy, Uddin et al. 1998; Nasrin, Ogg et al. 2000; Ghosh, Lacson et al. 2001). L'insuline

quand à elle phosphoryle les protéines Foxo (*Nasrin, Ogg et al. 2000*) entraînant leur exclusion du noyau (*Biggs, Meisenhelder et al. 1999; Brunet, Bonni et al. 1999; Takaishi, Konishi et al. 1999*) et la phosphorylation du co-activateur CBP/p300 (*Cichy, Uddin et al. 1998*) aboutissant à la dissociation de ce complexe avec la machine de transcription de base. Cependant, il a été montré récemment que l'effet de l'insuline sur la transcription du gène induite par les glucocorticoïdes peut se produire indépendamment de cet IRE (*Gan, Pan et al. 2005*). Un autre IRE situé entre -285 et -276 pb du promoteur IGFBP-1 est contigu à un CRE (-268/-248 pb) et semble plus impliqué dans l'effet de l'insuline sur la transcription de gène IGFBP-1 induit par l'AMPc. Peu de données sont actuellement disponibles mais il semble que les facteurs Foxo1 et c/EBP se fixent sur cet élément (*Neau, Chambery et al. 1995*).

3.2 Régulation positive par l'insuline

Il a été déterminé que l'insuline et le glucose agissent en synergie pour la régulation positive de l'expression des gènes lipogéniques en ciblant différentes régions du promoteur (*Dentin, Pegorier et al. 2004*). Cependant, l'insuline a une action spécifique sur les IRE. Après avoir étudié les promoteurs de la FAS et de l'EM, deux gènes clé de la lipogenèse de *nov*o, on a pu identifier plusieurs IRE dans les promoteurs de ces gènes.

3.2.1 FAS

Le premier IRE caractérisé au niveau du promoteur du gène de FAS lie les facteurs de transcription USF-1 et USF-2 chez les animaux réalimentés par un régime riche en sucre (*Naima Moustaid 1994; Sul 1995*). L'induction complète par l'insuline exige cependant l'intervention d'autres zones du promoteur. Il y a deux sites de liaison pour SREBP-1c qui ont été identifiés dans le promoteur FAS incluant une séquence classique de SRE située entre -150 et -141pb (*Latasa, Griffin et al. 2003*) et un site qui recouvre partiellement la région -65pb (*Tabor 1998*). L'insuline stimule aussi la transcription du gène FAS en augmentant les niveaux d'expression de la protéine de SREBP-1c (*Shimomura, Bashmakov et al. 1999; Azzout-Marniche, Becard et al. 2000*).

(Figure 4.A)

Des études chez des animaux transgéniques ont identifié le site SRE situé à -150 comme le site d'action pertinent de SREBP-1c (*Moon, Latasa et al. 2002; Latasa, Griffin et al. 2003*) et ont montré que SREBP-1c fixé à la région -150 résulte en l'activation maximale de la transcription du gène FAS en réponse à l'insuline par une action synergique avec USF qui se fixe à la région -65 pb (*Latasa, Griffin et al. 2003*). Dans les hépatocytes primaires, la région du promoteur de FAS située entre -151 et -42 pb et celle contenant la région -65, un site de liaison de SREBP-1, un site NF-Y et un site Sp1, ont aussi été impliquées dans l'effet régulateur de l'insuline et des carbohydrates sur la transcription de gène FAS. Une mutation au niveau de l'un de ces sites abolit en effet complètement l'action de l'insuline et du glucose sur la transcription de ce gène (*Magana, Koo et al. 2000*).

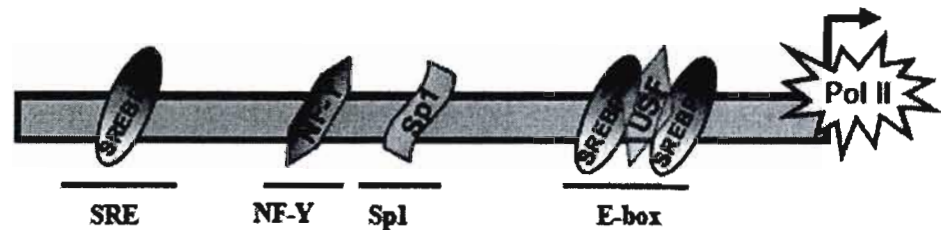
3.2.2 EM

La stimulation de la transcription du gène de l'EM par l'insuline fait intervenir deux éléments au niveau du promoteur : un motif AP1 (qui fixe les facteurs de transcription fos/jun) et un site de liaison Erg-1 (**Figure 4.B**). L'insuline induit l'expression des membres de la famille des fos/jun (*Mamounas, Ross et al. 1991*). Ainsi, il y a une augmentation de la fixation au niveau du complexe AP1 sur son site qui pourrait contribuer à la régulation positive de la transcription du gène de l'EM. Ceci est d'ailleurs en accord avec le fait que, dans le foie, l'inhibition de la synthèse protéique bloque l'expression de l'EM induite par l'insuline (*Katsurada, Iritani et al. 1989*).

Les études sur le site Erg-1 montrent une association consécutive des facteurs de transcription Sp-1 et Sp-3 sur cet élément. Le traitement insulinique quand à lui augmente l'expression du gène Erg-1 (*Bruning, Winnay et al. 1997; Shimano 1999*) résultant d'une augmentation de la disponibilité des protéines Erg-1 qui pourraient donc se fixer sur le site en un plus grand nombre et entraîner alors le déplacement de Sp1 (*Barroso and Santisteban 1999*). SREBP-1c a aussi été impliqué dans la régulation de la transcription du gène de l'EM en réponse à une réalimentation riche en sucre (*Iizuka, Bruick et al. 2004*). Pourtant, ses actions spécifiques sur le promoteur ne sont

pas encore caractérisées. Il est intéressant de souligner que l'implication de Erg-1 dans l'action de l'insuline sur le gène de l'EM est unique et démontre la diversité des mécanismes impliqués dans la régulation de la transcription des gènes par l'insuline.

A: Insulin target sequences in the FAS promoter



B: Insulin target sequences in the Malic Enzyme promoter

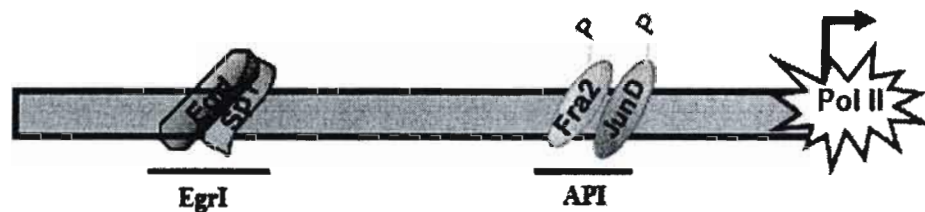


Figure 4: Schéma des promoteurs des gènes FAS (A) et ME (B)

Le schéma montre les différentes régions du promoteur impliquées dans la régulation de la transcription du gène par l'insuline. **A:** SRE: *sterol regulatory element*, NF-Y: *nuclear transcription factor Y*, Sp1: *specific protein 1*, SREBP-1c: *sterol regulatory element binding protein 1c*, USF: *upstream stimulatory factor 1*. Pol II: RNA polymerase II. **B-** Egr-1: *early growth response 1*, AP1: *adaptor related protein complex 1*. Sp1: *specific protein 1*, Fra2: *Fos-related antigen-2*. Pol II: RNA polymerase II. P indicates the phosphorylation. (Mounier C. et Posner BI., 2006)

**VOIES DE SIGNALISATION DE L'INSULINE IMPLIQUÉES
DANS LA RÉGULATION TRANSCRIPTIONNELLE**

Après fixation de l'insuline sur son récepteur membranaire, il y a activation de son activité tyrosine kinase et une autophosphorylation de ses sous unités β . Par la suite, les sous unités phosphorylées recrutent les substrats spécifiques de l'insuline IRS-1 et IRS-2 qui seront à leur tour phosphorylés. Ils recruteront par la suite la sous unité régulatrice p85 de la PI3-kinase permettant une association avec les sous unités catalytiques p110 et l'activation de cette lipide-kinase qui permettrait la phosphorylation des phospholipides membranaires, nouveau site de fixation et d'activation des différentes kinases en aval (*Alessi and Downes 1998; Yenush, Zanella et al. 1998*). **(Figure 5)**

Cette activation de PI3K est très importante pour la modulation transcriptionnelle des gènes par l'insuline. Ainsi, si on bloque l'activation de la PI3-kinase par des inhibiteurs pharmacologiques spécifiques (tels que *Ly-294002* ou *Wortmannin*), ceci abolit totalement l'effet de l'insuline sur la transcription des gènes *PEPCK*, *G6Pase* et *IGFBP-1* (*Sutherland, O'Brien et al. 1995; Band and Posner 1997; Dickens, Svitek et al. 1998; Sutherland, Waltner-Law et al. 1998*). L'expression d'un mutant dominant négatif de PI3-kinase induit l'activation de l'expression de *PEPCK* (*Matsumoto, Ogawa et al. 2002*), alors qu'elle inhibe la transcription du gène *G6Pase* (*Dickens, Svitek et al. 1998*). PI3-kinase a aussi été impliquée dans la régulation positive de l'expression des gènes de *FAS*, *SREBP-1* et de la glucokinase (*Wang and Sul 1998; Matsumoto, Ogawa et al. 2002*). Plusieurs autres kinases ont aussi été impliquées dans la régulation transcriptionnelle des gènes par l'insuline en plus de celle des PI3-kinases. L'activation de *AKT* semblerait aussi médier l'effet de l'insuline sur l'expression du gène *PEPCK* et de *G6Pase* (*Agati, Yeagley et al. 1998; Liao, Barthel et al. 1998; Schmoll, Walker et al. 2000*) en phosphorylant directement les facteurs de transcription *Foxo-1*, *HNF3 β* et *CREB* (*Ogg, Paradis et al. 1997; Brunet, Bonni et al. 1999; Chakravarty, Hanson et al. 2005*). *AKT* a aussi été impliquée dans l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de la *FAS* mais dans ce cas, les facteurs de transcription ciblés par cette hormone et modulant l'activité *FAS*, n'ont pas été identifiés (*Wang 1998*). Quelques études semblent démontrer le rôle de l'activation de *AKT* et des protéines *Foxo* dans la régulation négative de la transcription de *IGFBP-1* par l'insuline (*Cichy, Uddin et al. 1998*). Cependant, des études récentes ont démontré

le rôle unique de mTOR dans la régulation de IGFBP-1 en absence de phosphorylation des protéines Foxo (*Postner 2006*).

Les mécanismes de régulation du gène SREBP par l'insuline varient selon les tissus. Dans les hépatocytes primaires et les adipocytes de rat, l'activation de la voie PI3-kinase/AKT par l'insuline est responsable de l'augmentation de la transcription du gène SREBP-1 (*Fleischmann and Iynedjian 2000; Matsumoto, Ogawa et al. 2002; Nadeau, Leitner et al. 2004*). Au niveau des myocytes, il y a une activation de la voie de ERK, ce qui a été démontré par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de ERK (*PD98059*) ou par une surexpression d'un dominant négatif Ras (kinase en amont de Erk) (*Nadeau, Leitner et al. 2004*). Les voies des MAPK ont aussi été impliquées dans l'effet de l'insuline sur la transcription du gène de Erg-1 (*Keeton, Bortoff et al. 2003*), de la collagénase-1 (*Ayala, Boustead et al. 2004*) et des récepteurs aux LDL (Roth 2000) induisant une modulation de l'activité transcriptionnelle de Jun et Fra-2 pour le gène de la collagénase et de SREBP-1a et SREBP-2 pour les gènes codant pour des récepteurs aux LDLs.

Plusieurs études ont aussi impliqué GSK-3 dans la régulation de la transcription des gènes par l'insuline. Ainsi, au niveau du foie, GSK-3 inhibe l'effet de l'insuline sur le gène de la G6Pase et le gène de PEPCCK (*Patel, Lochhead et al. 2002*). Pour IGFBP-1, GSK-3 a aussi été impliqué mais son action est indépendante des Foxo (*Finlay, Patel et al. 2004*).

En conclusion, toutes les études qui ont été faites jusqu'à présent ont démontré que l'effet de l'insuline sur la transcription des gènes fait intervenir plusieurs voies de signalisation. De plus, des travaux récents ont montré que SREBP pourraient inhiber la transcription du gène IRS-2 menant à l'inhibition de PI3-kinase et d'AKT (*Taouis, Dridi et al. 2001*).

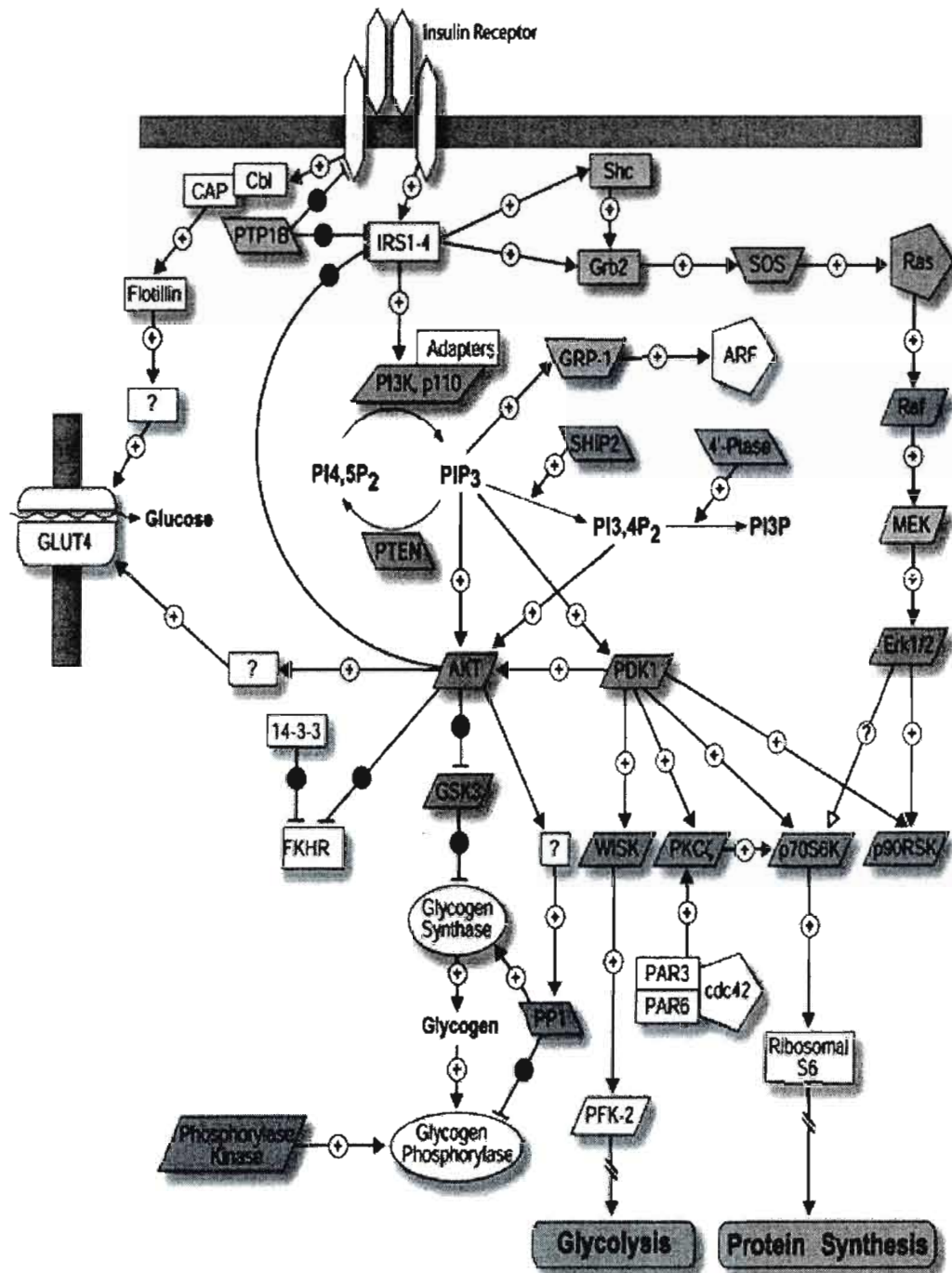


Figure 5 : Principales voies de signalisation par l'insuline: voies PI3 kinase et MAP kinase.
www.npaci.edu/online/v6.25/insulinreceptor.html.

CHAPITRE II

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

1. Localisation de l'élément de réponse à l'insuline

Comme précisé plus haut, plusieurs études ont démontré que l'insuline augmente l'activité enzymatique de SCD1 et le taux d'ARNm (*Lefevre 1999*). Cependant, les mécanismes précis de l'action de l'insuline sur le gène SCD1 ne sont pas encore connus. Il a été démontré aussi que suite à plusieurs délétions effectuées sur le promoteur de SCD1 (délétions de 1 à 6), toutes ces délétions répondent à l'action de l'insuline suite à leur transfection dans des hépatocytes embryonnaires de poulet (*Lefevre 2001; Mauvoisin D. 2007*). Ceci veut dire qu'il existe au moins un élément de réponse à l'insuline qui est présent au niveau de la dernière délétion SCD1-6. On se propose dans cette étude de localiser précisément cet élément de réponse à l'insuline au niveau des 372 paires de bases de cette région proximale.

2. Identification des facteurs de transcription

Suite au séquençage et à l'analyse informatique de la dernière délétion de 372 paires de bases (**Figure 3**), nous avons remarqué qu'il y a présence de plusieurs sites putatifs de fixation de nombreux facteurs de transcription qui sont déjà connus pour avoir un rôle dans la régulation par l'insuline au niveau de plusieurs gènes (comme SREBP, NF-Y, Sp1, USF). Nous avons voulu savoir si l'un ou plusieurs de ces facteurs sont impliqués dans la réponse à l'insuline au niveau du promoteur du gène SCD1. Pour ceci, les techniques de retard sur gel et de Supershift ont été utilisées.

CHAPITRE III

MÉTHODOLOGIE

1. Préparation des plasmides contenant le promoteur SCD1

Les différentes constructions utilisées dans cette étude (de SCD1-1 à SCD1-6), proviennent du laboratoire de C. Diot (*Lefevre 2001*). Elles contiennent les différentes délétions effectuées sur le promoteur de SCD1 qui ont été clonées en amont du gène rapporteur de la mouche à feu luciférase dans le vecteur pGL2-basic (*Promega*). Pour la construction SCD1-7, elle a été préparée après délétion d'un fragment de 75 paires de bases du fragment contenu dans la construction SCD1-6. Le fragment délété contient les sites de fixation des facteurs de transcription SREBP et NF-Y.

1.1 Coupures par enzymes de restriction

Les enzymes utilisées pour la construction SCD1-7 sont *Sma I* (*NEB*) enzyme qui se trouve sur l'extrémité 5' des sites de clonage du vecteur pGL2-basic), et *NruI* (*NEB*) enzyme qui ne digère pas dans le vecteur pGL2-basic et qui a un seul site de coupure sur la séquence de SCD1-6). Les digestions ont été faites séparément à cause de la différence de la température de digestion et de l'incompatibilité des tampons de chaque enzyme. Une extraction par phénol-chloroforme a été nécessaire entre les deux digestions pour le changement des tampons de réaction.

1.2 Purification de l'ADN et ligation

Après migration sur gel d'agarose (1%), la bande à 5.6 Kpb correspondant au vecteur ouvert, dépourvu des sites de fixation de SREBP et de NF-Y, a été découpée à partir du gel, puis l'ADN a été extrait à partir de l'agarose grâce au kit Qiaex II (*Qiagen*) suivant les instructions du manufacturier. On a par la suite procédé à la ligation des extrémités de ce vecteur, on a pris 10 µl de cet ADN purifié auquel on a rajouté 1 µl de T4-ligase (*Qiagen*) et la ligation a été faite dans un volume de 20 µl pendant 2 heures à température ambiante. (**Figure 8A**)

1.3 Transformation bactérienne

Le produit de ligation a été mis en présence de 50 µl de bactéries compétentes (DH5-α) et ceci sur glace pendant 30 minutes. Après un choc thermique à 42°C pendant 90 secondes, le tout était mis à incuber pendant une heure à 37°C sous agitation en

présence de milieu LB (favorisant la croissance des bactéries). Par la suite, les bactéries ont été concentrées par une centrifugation pendant 5 min à 1000 rpm à 4°C et resuspendues dans 200µl de LB en présence de l'antibiotique (ampicilline à 50mg/ml) pour éliminer les bactéries indésirables qui n'ont pas intégré l'ADN recombinant qui contient le gène de résistance à l'ampicilline. Les bactéries sont par la suite étalées ces sur des pétries contenant le même milieu et de l'ampicilline et sont incubées pendant 12 heures à 37°C. Le lendemain, les colonies qui ont poussé ont été prélevées et mis en préculture dans 5 ml de milieu LB contenant l'ampicilline (50 mg/ml) puis laissées incubé pendant 12 heures à 37°C sous agitation.

1.4 Préparation d'ADN et vérification du clonage

L'ADN a été préparé à partir des précultures des colonies qui ont poussé après la transformation bactérienne grâce au kit Miniprep (*Qiagen*) selon les instructions du manufacturier. Par la suite, la vérification du clonage a été effectuée après digestion de l'ADN par les enzymes de restriction *Bam HI* et *XhoI* qui devaient donner deux fragments de 2,7 et 2,9 Kpb (**Figure 8B**). La migration sur gel de l'ADN digéré par *NruI* (enzyme qui coupe une fois chez les constructions SCD1-6 et qui n'a pas de site de coupure chez les nouvelles constructions) a permis de confirmer la délétion attendue du fragment de 75 pb (**Figure 8B**).

1.5 Maxi-préparation d'ADN par la technique de CsCl

Afin de maximiser les efficacités de transfection dans les hépatocytes de poulet en culture primaire ainsi que dans les cellules de la lignée HepG2, nous purifions l'ADN au laboratoire sur gradient de chlorure de césium. Une fois la vérification de la construction terminée, on procède à une maxi-préparation de l'ADN sur gradient de chlorure de césium (CsCl), ce qui va permettre l'obtention d'un ADN plus concentré et de meilleure qualité. A partir de 500 ml de milieu de culture bactérienne contenant l'ADN à amplifier, on fait une série de centrifugation et une précipitation avec l'isopropanol. Par la suite, on rajoute du chlorure de césium et on centrifuge à 44000 rpm pendant 24 heures permettant la séparation de l'ADN plasmidique et bactérien. Le

CsCl est séparé de l'ADN purifié à l'aide de colonnes Centricon-30 ce qui permet aussi de le concentrer.

2. Culture cellulaire

Deux types de cellules ont été utilisés dans cette étude, il s'agit des CEH (culture primaire d'hépatocytes embryonnaires de poulet) et des HepG2 (cellules d'hépatocarcinome humain).

2.1 Préparation des CEH

Des hépatocytes embryonnaires de poulet (CEH) sont isolés selon le protocole de A. G. Goodridge avec quelques modifications (*Goodridge, Garay et al. 1974*). Ces modifications ont été faites dans notre laboratoire. Les foies d'embryons de poulet de 19 jours sont prélevés et après avoir retiré la vésicule biliaire, ces foies seront plongés dans une solution froide de MKRBB (Modified Krebs Ringer Bicarbonate Buffer) contenant de l'EGTA (0.5M). Cette solution a préalablement été gazéifiée pendant une heure (95%O₂, 5%CO₂) puis filtrée. Les foies seront découpés en petits morceaux à l'aide de ciseaux et transférés par la suite dans une autre solution de MKRBB contenant de l'EGTA. Après une heure d'incubation à 40°C dans un bain-marie avec agitation et une centrifugation à 4°C à 900 rpm, les tissus sont resuspendus dans une solution froide de MKRBB contenant du CaCl₂ (0.555M) et de la collagénase H (0.5M) (*Roche*), qui permet de digérer la matrice extracellulaire et de séparer les hépatocytes et incubées 30 minutes encore une fois à 40°C après gazéification. Par la suite, on filtre les cellules sur bas de nylon (permettant d'éliminer les fragments non digérés), on centrifuge 5 minutes à 4°C et 550 rpm. Par la suite, on resuspend le culot dans du MKRBB froid et on laisse décanter les cellules à température pièce afin de permettre la séparation des hépatocytes et des hématies. Le culot de cellules contenant les hépatocytes seront par la suite resuspendus dans du MKRBB et, après une dernière centrifugation, les hépatocytes seront resuspendus dans du milieu Waymouth (*Sigma*) puis dilué au 1/10^{ème} dans ce même milieu. À la fin, ces cellules seront mises en plaque

(2 ml de cellules diluées par puits) dans des plaques de type C+ (*Sarstedt*) (qui permettent une forte adhérence cellulaire) et incubées à 39°C en présence de 5% de CO₂.

2.2 Culture des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont cultivées dans du milieu MEM (*Sigma*) contenant 10% de SVF (sérum de veau fœtal) et des antibiotiques (streptomycine 60 µg/ml, pénicilline 100µg/ml). Ces cellules ont été mises en culture à 37°C dans des flasques (*Corning*). Une fois à confluence, elles ont été mises en contact avec 1 ml de trypsine (2.5%) (*Gibco*) à fin de les décoller, puis récoltées dans le même milieu de culture MEM contenant le sérum et les antibiotiques. La mise en plaque se fait dans des plaques à 6 puits (*Corning*) (environ 1 à 2.10⁶ cellules par puits), le tout est incubé à 37°C pendant 24 ou 48 heures, le temps d'atteindre 80% de confluence cellulaire pour permettre une meilleure transfection.

2.3 Transfection

2.3.1 CEH

Environ 6 heures après la mise en plaque, on change le milieu de culture des cellules après avoir effectué une série de lavage avec du PBS 1X stérile. Par la suite, les cellules seront transfectées par un mélange contenant 2µg d'ADN par puits en présence de 15µl de Lipofectine (*Invitrogen*). L'ADN transfecté est un mélange d'ADN de chacune des différentes constructions SCD1 étudiées (1,5 µg) et du plasmide CMV β-galactosidase (0,5 µg), vecteur qui va nous permettre d'évaluer l'efficacité de la transfection. Par la suite, les plaques seront remises dans l'incubateur à 39°C. Après une nuit d'incubation, on effectue une série de lavage avec du PBS 1X stérile et on change le milieu de culture des cellules, puis on procède à des stimulations des puits concernés par 50 nM d'insuline en présence ou non d'inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation et on remet les plaques à incuber 24 heures à 39°C.

2.3.2 HepG2

Pour les cellules HepG2, on change le milieu de culture tous les deux jours après une série de lavage au PBS 1X et ce, jusqu'à ce que les cellules atteignent un taux de confluence de 80% à fin d'optimiser les conditions de transfection. L'agent de transfection utilisé ici est la Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*), utilisé à raison de 5 μ l pour de 2 μ g d'ADN total par puits. Les cellules sont mises à incuber à 37°C pendant une nuit, puis sont soumises à des stimulations par 50 nM d'insuline avant d'être remis dans l'incubateur à 37°C.

2.4 Lyses cellulaires et essais biochimiques

Après 24 heures de stimulation, les différents types de cellules seront rincées deux fois avec du PBS 1X froid, puis lysées pendant 30minutes dans 500 μ l de dans un tampon de lyse (1X) [125 mM Tris base, 10 mM H_3PO_4 , 5% Triton X-100, 50% Glycerol]. Par la suite, le surnageant va être centrifugé à 4°C pendant 15 minutes à vitesse maximale afin d'éliminer les débris cellulaires. Les extraits cellulaires seront par la suite récupérés dans de nouveaux tubes et une série d'essais biochimiques vont être effectuée.

2.4.1 Essai luciférase

Les extraits cellulaires sont déposés sur une plaque de 96 puits auxquels sera rajouté le tampon d'essai luciférase (20mM Tricine, 1.07mM $(MgCO_3)_4 \cdot Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 2.67mM $MgSO_4$, 0.1 mM EDTA, 220 μ M Coenzyme A, 4.7 μ M D-Luciferin potassium salt, 530 μ M ATP, 33.3mM DTT). La lecture sera effectuée par un luminomètre qui va injecter la même quantité de 100 μ l de tampon de lecture sur 40 μ l d'extraits cellulaires. Les valeurs données par l'appareil vont indiquer l'activité luciférase dans chaque puits démontrant le niveau d'activité promotrice du fragment étudié.

2.4.2 Essai β -galactosidase

Pour les essais de la β -galactosidase, on va effectuer un dosage de l'activité β -gal générée dans les cellules transfectées afin d'évaluer l'efficacité de la transfection qui pourrait varier d'un puits à un autre et d'une préparation d'ADN à une autre. Pour cela, on rajoute à 10 μ l de lysat cellulaire, 269 μ l d'un mélange de solution contenant 3 μ l de Mg100X (0.1M MgCl_2 , 4.5M β -mercaptoéthanol), 66 μ l de l'ONPG (13mM) et 200 μ l de NaPO_4 (200mM $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 200mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Après 30 minutes d'incubation au bain-marie à 37°C (jusqu'à l'apparition de coloration jaune), on a arrêté la réaction avec 500 μ l d'une solution de Na_2CO_3 (1M) et on effectue des mesures de la densité optique à 420 nm.

2.4.3 Dosage protéique

Pour le dosage protéique, on utilise la méthode de Bradford (Bradford 1976) pour évaluer la quantité de protéines. Il s'agit de rajouter à la même quantité d'extraits cellulaires une solution de Bio-Rad (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) préalablement diluée au 1 :4. On prépare en même temps une courbe standard dont la quantité de protéine BSA varie de 0 à 25 μ g. La lecture de la densité optique est effectuée à 595 nm et on va se servir des valeurs obtenues pour les quantités connues de protéines (BSA) afin de tracer une courbe standard qui va nous permettre de déterminer les quantités de protéines présentes pour chaque extrait cellulaire à partir de leurs densités optiques obtenues.

2.4.4 Détermination de l'activité luciférase standardisée

L'activité luciférase standardisée sera calculée à partir des valeurs obtenues pour l'activité luciférase, de la quantité des protéines et de l'activité β -galactosidase et ceci en faisant le rapport de l'activité luciférase et de la quantité de protéine par rapport à l'activité β -galactosidase mesurée. Le test statistique Student T-test ou pair T-test sera utilisé pour évaluer la signification de nos résultats.

3. Retards sur gel

3.1 Choix des amorces

Les oligonucléotides utilisés pour réaliser ces expériences ont été synthétisés à partir du résultat du séquençage et de l'analyse informatique de la dernière délétion de 372 paires de bases (GenBank 8036649). Ceci nous a montré qu'il y a présence de plusieurs sites de fixation putatifs de nombreux facteurs de transcription qui sont connus pour avoir un rôle régulateur au niveau transcriptionnel suite à une stimulation par l'insuline (*Mounier and Posner 2006*) (**Figure 4**). Nous avons donc synthétisé des amorces contenant ces sites séparément et à l'aide de la technique de retard sur gel nous avons analysé la fixation de facteurs de transcription en présence et en absence d'insuline.

3.2 Préparation d'extraits nucléaires

Les extraits nucléaires ont été préparés selon le protocole de Dignam (*Dignam, Lebovitz et al. 1983*). Brièvement, après 24 heures de stimulation par 50 nM d'insuline, on effectue des rinçages des cellules avec du PBS 1X puis on récolte les cellules dans 1 ml du même tampon et on centrifuge 10 minutes à 4°C à 2000 rpm. Les culots sont resuspendus dans du PBS puis on recentrifuge dans les mêmes conditions. Après addition de 400 µl de tampon A (10 mM HEPES, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 2 µg/ml aprotinine et leupeptine) on laisse reposer 5 minutes sur glace. On recentrifuge encore une fois dans les mêmes conditions et on resuspend le culot dans 2 volumes du tampon A. Par la suite, les cellules seront lysées par un homogénéiseur Dounce (piston de type B) (ceci va permettre de briser la membrane plasmique sans toucher au noyau). Après, on centrifuge les cellules lysées 2 minutes à 4°C à 2000 rpm afin d'obtenir un culot contenant les noyaux. Ces derniers vont être resuspendus dans 100 µl de tampon C (20 mM HEPES, 25% glycérol, .42 M NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 2µg/ml aprotinine et leupeptine) (tampon isotonique qui va permettre d'éclater les noyaux et d'en récupérer leurs contenus). Les noyaux vont être lysés par l'homogénéiseur Dounce et laissés 30 minutes sur glace avec légère agitation et centrifugés 30 minutes à 4°C à 25000g. Le surnageant récupéré

va subir une dialyse à l'aide d'une membrane de type Spectra Pore (diamètre de porosité de 16 mm) (*Spectrum*) qui va permettre d'éliminer les sels et de récupérer les protéines nucléaires (la membrane de dialyse ayant des pores qui permettent le passage des molécules ayant un poids moléculaire supérieur à 8000 Da). Cette dialyse se fera dans un tampon D (20 mM HEPES, 20% glycérol, 0.1 M KCl, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 2µg/ml aprotinine et leupeptine) à 4°C pendant une nuit. Par la suite, les extraits protéiques vont être récupérés puis centrifugés 20 minutes à 4°C à 25000g. On récupère le surnageant qui va contenir les protéines nucléaires. Elles vont être dosées par la méthode de *Bradford*. (Voir paragraphe 2.4.3).

3.3 Marquage des oligonucléotides

Les oligonucléotides contenant les séquences consensus reconnus par les différents facteurs de transcription analysés ont été marqués radioactivement par le [γ - P^{32}] ATP puis mis en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par l'insuline. Pour le marquage de la sonde, on commence par marquer un seul oligonucléotide. Pour ce, 50 ng d'oligos sens sont mis en présence de 2 µl de tampon de T4PNK, 1.5 µl de l'enzyme T4 polynucléotide kinase (T4PNK) et de 1 µl de [γ - P^{32}] ATP (10 µCi). Le volume est complété à 20 µl avec de l'eau nanopure et placé à 37°C pendant 30 minutes, puis on rajoute 2 µl de EDTA (0.5 M pH 8.0) et 28 µl H₂O pour arrêter la réaction. Pendant ce temps, la colonne de type G25 (*Pharmacia*) était préparée selon les recommandations du manufacturier, et ce afin de purifier le premier oligo marqué. La totalité du mélange contenant l'oligo marqué a donc été déposée au centre de la résine. Le tout a été centrifugé une première fois à 3400 rpm pendant 2 minutes, puis après avoir rajouté 38µl d'eau, on effectue une deuxième centrifugation à 3400 rpm pendant 2 minutes. On récupère un volume de 88 µl du brin sens radioactif auquel on rajoute 100ng du brin complémentaire anti-sens et 10 µl du tampon d'appariement 10X (1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT), puis on chauffe le mélange pendant 10 minutes à 90°C. On laisse le mélange refroidir lentement pendant 2 heures à fin de permettre l'appariement des deux fragments d'ADN pour former l'ADN double brin marqué.

On prend 5µl de cette solution à laquelle on rajoute 10µl de polydIdC (2 µg/µl), 10 µl de BSA (10mg/ml), 20 µl de tampon de ligation 10X (100 mM HEPES pH 7.9, 40% glycérol, 10% Ficoll, 250 mM KCl, 250 mM NaCl, 10 mM DTT, 5 mM EDTA) et 10 µl d'eau nanopure. À ce mélange on rajoute 10 µg de protéines nucléaires et on laisse le tout incuber 30 minutes à température ambiante avant de rajouter 1 µl de tampon de charge (20% Ficoll, 0.2% bleu de bromophenol, 0.2% xylène cyanol) et de déposer sur gel de polyacrylamide non dénaturant (6% acrylamide, 0.5X TBE, 2.5% glycérol). La migration se fait pendant 2 heures à 120 Volts.

Si la séquence d'ADN est capable de fixer des facteurs de transcription en présence d'insuline, il y aura formation d'un complexe ADN-protéine qui va se traduire par un retard de migration sur le gel en comparaison avec la sonde qui ne fixe pas de protéines.

3.4 Compétition spécifique et mutation

Afin de démontrer la spécificité de la fixation de ces protéines sur l'ADN, des expériences de compétitions spécifiques ont été effectuées. Pour ce, les sondes 1 et 2 ont été marquées radioactivement par le γ ATP³² comme décrit précédemment puis mis en présence de 6 ug d'extraits nucléaires de cellules stimulées ou non par 50nM d'insuline. À ce mélange on a rajouté des concentrations croissantes (10X, 25X, 50X et 100X) de la même sonde utilisée sans qu'elle soit marquée par le γ ATP³². Si la protéine ciblée reconnaît spécifiquement l'oligo marqué, elle va sûrement reconnaître l'oligo non marqué et il va y avoir une compétition de ces deux sondes pour la même protéine. Ceci va se traduire sur le gel par une diminution de la fixation de la protéine sur la sonde marquée au fur et à mesure que l'on augmente la quantité de sonde non marquée.

Pour confirmer que c'est bien les sites de fixation de ces sondes qui ont été fixés par des protéines, on a préparé les mêmes sondes 1 et 2 avec des mutations au niveau des sites de fixation de SREBP et de NF-Y pour la sonde 1 (GCG AAC CATCACAGACGG CAGC TTCGAGGCAGG) et de NF-Y pour la sonde 2 (TCCCGCAGTTTCGACGGCTCG). Ces sondes ont été marquées radioactivement par le γ ATP³² comme pour les autres sondes, puis mis en présence de la même quantité d'extraits nucléaires (6ug) stimulées ou non par 50nM d'insuline. Le tout a été déposé

sur gel. Si les protéines fixent bien les sites des facteurs de transcription SREBP et NF-Y, on ne devrait pas avoir de bandes retardées en présence des sondes dont le site de fixation a été muté.

3.5 Analyse par SuperShift

Afin d'identifier les protéines qui se sont fixées sur l'ADN nous avons utilisé des anticorps spécifiques dirigés contre des protéines spécifiques. Dans ce cas, les anticorps rajoutés au milieu vont se fixer à leur tour sur leurs protéines cibles et il va y avoir formation d'un complexe (oligonucléotide / Facteur de transcription / anticorps) encore plus important qui va être traduit par un retard encore plus important sur le gel ou SuperShift. Lorsque l'anticorps se fixe sur la protéine, il va y avoir changement au niveau de la conformation de la protéine ce qui va causer son détachement de l'ADN, et par la suite disparition de la bande retardée sur le gel. Ceci va dépendre de la nature de l'anticorps utilisé et de son efficacité. Pour la réaction en tant que telle, on incube 10µg d'extraits protéiques en présence de l'ADN marqué radioactivement pendant 20 minutes à température ambiante, puis on rajoute 2µl de l'anticorps correspondant (anti-SREBP-1 (*SantaCruz-13551*) et anti-NF-Y (*SantaCruz-13045*)). Le mélange est laissé 30 minutes sur glace avant de migrer sur gel.

Ce type d'expérience va nous permettre de confirmer l'identité de ces protéines qui se sont fixées sur cet ADN suite à une stimulation par l'insuline.

3.6 Révélation

Une fois la migration terminée, les gels de polyacrylamide contenant les différentes bandes retardées vont être séchés 1 heure à 80°C avant d'être exposés à un écran Kodak pendant 2 à 12 heures (selon l'intensité du signal), puis la révélation va se faire à l'aide du PhosphoImager (Molecular Imager FX *Bio-Rad*). La quantification de l'intensité du signal sera faite à l'aide du logiciel Quantity One 1-D Analysis (*Bio-Rad*).

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

1. Activités luciférase des constructions SCD1-1 à SCD1-6 :

Nous avons évalué l'effet de l'insuline sur les différentes constructions du promoteur SCD1 cloné en amont du gène rapporteur de la luciférase et transfecté dans des hépatocytes embryonnaires de poulet. Les cellules ont été mises en culture comme indiqué dans le point méthodologie (Méthodologie.2.1) puis stimulées par 50 nM d'insuline. La mesure de l'activité luciférase a été établie après standardisation avec la quantité protéique et la mesure de la β -galactosidase.

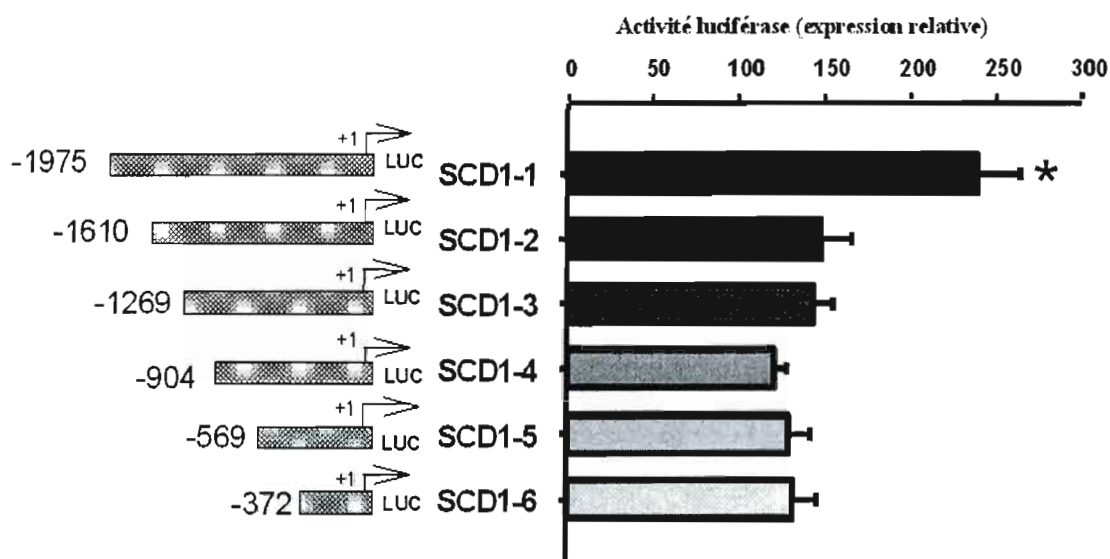


Figure 6 : Mesure de l'activité luciférase sur les différentes constructions du promoteur du gène aviaire SCD1 (SCD1-1 à SCD1-6) dans des CEH en présence de 50nM d'insuline. Les résultats représentent le niveau de stimulation par l'insuline pour chaque construction testée (activité basale/activité stimulée).

Ce que l'on peut déduire de cette figure, c'est que toutes les constructions des différentes délétions effectuées sur le promoteur du gène SCD1 (délétion SCD1-1 à SCD1-6) répondent à l'action de l'insuline. On remarque qu'il y a une diminution statistiquement

significative de l'activité luciférase entre SCD1-1 et SCD1-2. Les délétions successives ne diminuent pas plus le niveau de stimulation. Il faut souligner que la construction SCD1-6 répond toujours à l'insuline. Ces résultats suggèrent qu'il y a au moins 2 éléments de réponse à l'insuline dans le promoteur du gène aviaire SCD1. Un localisé entre -1975 et -1610 pb et l'autre se situant dans les 372 premières paires de bases.

2. Caractérisation de l'élément de réponse à l'insuline dans la partie proximale du promoteur SCD1

La séquence totale du promoteur du gène aviaire de SCD1 a été déterminée et confirmée après comparaison avec le génome du poulet déjà publié. La séquence obtenue a ensuite été soumise à *Genbank* et elle est maintenant disponible sous le numéro *DQ645535* (**Figure 7**). L'analyse informatique de la séquence permettant la recherche de site consensus pour la fixation de facteurs de transcription a ensuite été réalisée grâce au logiciel *Geomatix*. Cette analyse révèle la présence de différents sites consensus de fixation pour plusieurs facteurs de transcription entre -1975 et -30 pb. La plupart de ces facteurs de transcription ont déjà été identifiés comme pouvant être impliqués dans la régulation transcriptionnelle de différents gènes en réponse à l'insuline (**Tableau III**).

Cependant, dans notre étude nous avons focalisé sur la caractérisation des éléments de réponse à l'insuline situés dans les 372 premières paires de bases. Une analyse détaillée de ces 372 pb est présentée dans la figure 8.

```

1 gccgtgctct gcatctgcag aaagaaactg gtaggaaagg aaagggacct ggtgggtctc
61 agtttctgta aaattgtaac cctggaatcc ccaagagcct cctttttacc agctggtagc
121 atgtccccgc tctgtggcac tgaggttatt ttcacatgt ggcacgagct gctatacata
181 aatatatgct aatcaacaag tacccaagta tcaccttact tcttttctct tctttattta
241 ttaccctggt ttttctttct cttatttctt taggatagcg ttttagcaca gtgctcttcc
301 aacactcacg tacaaagtaa gtagaatctt taactaaatc attgtttctc tccagtgttc
361 agtaaccatc agcattgtta accaagcatt taacagagag ccttaaaaga gatgggttaa

```

421 atccctctct gactcatgcc agctttcact gtctaggaac gtcttctgtt gtgggttctc
 481 tctttcaata ttgtgtctga gagcaggcaa gacgtgattt tctaacgtaa aattataaca
 541 cagacccttc tcagacctct tcatccatca cagcgagatg aaaaaggaga gacacatttt
 601 ttcccttttg ccagccacct ctggatacag agaacaactg agctgctgtt atttttcttt
 661 gtcgcttttt catcccagtg attacaatgc agctcacttt tgacagctgc cactgaatca
 721 gccccactgt gtgtgagctg ggtcagcccg gggatggact gactctgcaa gaaagtgggt
 781 gtccatctgc acctcctttg gtcggctcct tcaactgagag acagctgcct aggcaggata
 841 tggctcaggc ataggggcac atttcaacat gccttttgac gtctctgttc cactgtgagt
 901 cctgtgagag ggggtggcac tgcctgaaca gggggcacac tgcagttggg gtaatggcag
 961 tgaggcatcc caggcccttc tgctgaacat ctgaggggtgc ctggcatggt ggccacacgg
 1021 tggggttagg agagctgccg cagctctgcc accaggaagg cagcagctgg agggctctct
 1081 tcacttttaa tgggaaatgt ctccctggta aagagcccca gcaacaagga aatgcggggt
 1141 ctgttactgg ggctggtag aacgttgta cggaataag ctgataccaa accgagcttt
 1201 taattttttt tcctcttctt ctgccctcca ccagaaagaa ctgtttgctg gtgtaaaatg
 1261 cacaggattc attttaaagg ttacagccaa cgttttccag actgtttgtg tatatcaaga
 1321 taaaacccta tacaggtata cgtgtggatc cagacatata gttgtgaatg tgcttttctc
 1381 cacaaaaaac aaaaacaaaa acaaaaaaaaa aaccatacga tttttataca tatacatata
 1441 gatctccgta gagctcccaa tacagagcag ctgtctgaca atgaagcca ttctttccaa
 1501 ttcgctggcc acgaaggggt ctccgcgcc ctcttgcttc gctccgggca gccccgctgc
 1561 cggggggcgg ctgctccgtg gagccccgcg cggagcgcag cagagcgggt gcgcgccgca
 1621 gcagcgcccg cgcaggggtg gcgcgcggg gagcgaacag cagattgcgg gcagccaatg
 1681 gcgagggcaa gccgaggtg caccaaattt cccgcagcca atcggctcgc gaggaggagg
 1741 aaaaaaaaag aaaaaagaaa aaaaaaaaaa aaaggaggaa aaaaaaaaaa tcagccaggc
 1801 atcatgcgag agcctggccc tcgccatcct cctcttcttc agcatccttc ctcccgccta
 1861 ccggtccgtc ccacctcccc ttctgggcac gccgagagcc aagccccgc tgctactcgc
 1921 cgcccgccgc actgacccca cgcctctcgc agcgggcagg gggtcacagg gaggcggggg
 1981 tgccgagagc ccggccccgc ttaaatacct ccgcacccgc ctcccagcc gcacaactcg

2041 cccggggagg ggccgacagc agtcagagtc ccgcagcagc agccgccgcc gccgccgcca
 2101 ccaccaccgg ggacatccgc gcaccgccgc cgagggacag ggacacggta gccca

Figure 7 : Séquence totale du promoteur du gène aviaire de SCD1. La flèche indique le site d'initiation de la transcription. (*GenBank DQ 645535*).

Tableau III : Analyse informatique de la séquence du promoteur de SCD1 avec les différents facteurs de transcription se fixant sur cette séquence. L'analyse a été effectuée par le logiciel *Genomatix*.

<i>Facteurs de transcription</i>	<i>Position sur la séq</i>	<i>sens</i>
E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	58 - 78	(+)
Hepatic nuclear factor 1	65 - 81	(-)
Upstream stimulating factor 1/2	153 - 165	(-)
CCAAT/enhancer binding protein	294 - 308	(-)
Hepatic nuclear factor 1	319 - 335	(-)
E4BP4, bZIP domain, transcriptional repressor	352 - 372	(+)
Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	378 - 392	(+)
Activator protein 1	428 - 438	(+)
Sterol regulatory element binding protein	1017 - 1031	(-)
Activator protein 4	1058 - 1074	(-)
NF-kappaB (p50)	1545 - 1557	(-)
Activator protein 2	1556 - 1570	(+)
Stimulating protein 1, ubiquitous zinc finger transcription factor	1561 - 1575	(+)
Nuclear factor Y (Y-box binding factor)	1714 - 1728	(+)
Interferon regulatory factor 4	1890 - 1910	(+)
Sterol regulatory element binding protein	1930 - 1944	(+)
Activator protein 2	2037 - 2051	(+)

-372 AC CGAAC**AG CAGATTGCGG** GCAG**CCAATG** GCGAGGGCAA GCCGAGGTGG
 SRE like *NF-Y*
 -330 CACCAAATTT CCCGCAG**CCA AT**CGGCTCGC GAGGAGGAGG AAAAAAAAAAG
 NF-Y
 -280 AAAAAAGAAA AAAAAAAAAA AAAGGAGGAA AAAAAAAAAA**TCAGCCAGGC**
 SRE
 -230 ATCATGCGAG AGCCTGGCCC TCGCCATCCT CCTCTTCCTC AGCA**TCCTTC**
 USF
 -180 **CTCCGCCCAC CGGTCC**GTCC CACCTCCCTT CTGGCAGCC GAGAGCCAAG
 Sp1
 -130 CCCCCGCTGC TACTCGCCGC CCGCCGCACT GACCCACGC ATCTCGCAGC
 -80 GGGCAGGGGG TCACAGGGAG GCCGGGGTGC CGAGAGCCCG GCCCCG**CTTA**
 -30 **AAT**ACCTCCG CACCCGCCTC CCC**A**GCCGCA CAACTCGCCC GGCGAGGGGC
 TATA-box
 +28 CGACAGCAGT CAGAGTCCCG CAGCAGCAGC CGCCGCCGCC GCCACCACCA
 +78 CCGGGGACAT CCGCGCACCG CCGCCGAGGG ACAGGGACAC GGTAGCCA

Figure 8 : Séquence et analyse informatique de la délétion SCD1-6 (372 premières paires de bases proximales du promoteur) et les différents sites putatifs de fixation des facteurs de transcription. La flèche indique le site d'initiation de la transcription. Les différents sites putatifs de fixation des facteurs de transcription sont indiqués en gras et soulignés. *SRE*: sterol response element, *NF-Y*: nuclear factor Y, *USF*: upstream stimulating factor, *Sp1*: stimulating protein 1.

Les résultats du séquençage et de l'analyse informatique de la séquence de SCD1-6 nous montre la présence de plusieurs sites de fixation de différents facteurs de transcription qui sont déjà connus pour avoir un rôle régulateur par l'insuline au niveau d'autres gènes (**Figure 8**). On veut déterminer s'ils sont impliqués ou non dans la régulation du promoteur du gène SCD1 par l'insuline.

3. Choix des amorces et les retards sur gel

Par la suite, nous avons voulu déterminer quels sites sont impliqués dans la régulation de l'activité transcriptionnelle du promoteur SCD1 par l'insuline. Pour cela, nous avons synthétisé 4 oligonucléotides contenant les différents sites putatifs de fixation de facteurs de transcription déterminés par analyse informatique qui seront utilisés pour réaliser des expériences de retard sur gel en utilisant des extraits nucléaires de cellules de la lignée d'hépatome humain HepG2. Les différents sites ciblés ont été encadrés (**Figure 9**).

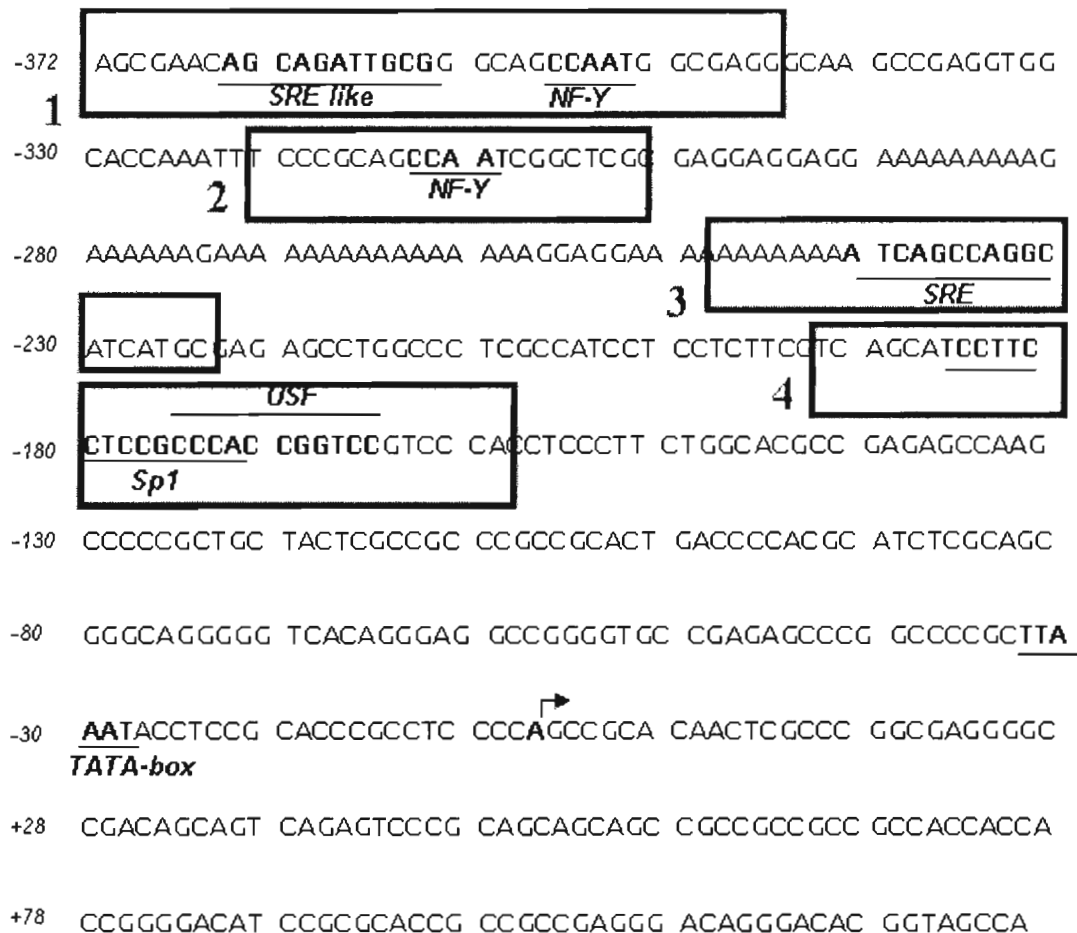


Figure 9 : Choix des sondes pour l'analyse de retard sur gel. Les carrés indiquent les sondes choisies pour réaliser les analyses de retard sur gel. Les numérotations pour chaque sonde sont indiquées.

L'amorce 1 contient un site SRE et un site NF-Y, l'amorce 2 contient un site NF-Y, l'amorce 3 contient un site SRE et l'amorce 4 contient un site Sp1 et un site USF. Ces différentes amorces sont constituées de 2 oligonucléotides dont un est marqué avec du $[\gamma\text{-P}^{32}]$ ATP et qui après hybridation vont être incubées avec différents extraits nucléaires préparés à partir de cellules HepG2 cultivées en présence ou en absence d'insuline (voir matériel et méthodes). La révélation de la présence de bandes retardées démontrant la fixation de facteurs de transcription sur l'ADN est réalisée par la suite sur gel d'acrylamide non dénaturant. Les autoradiographies de gels représentatifs sont présentées dans la figure 10.

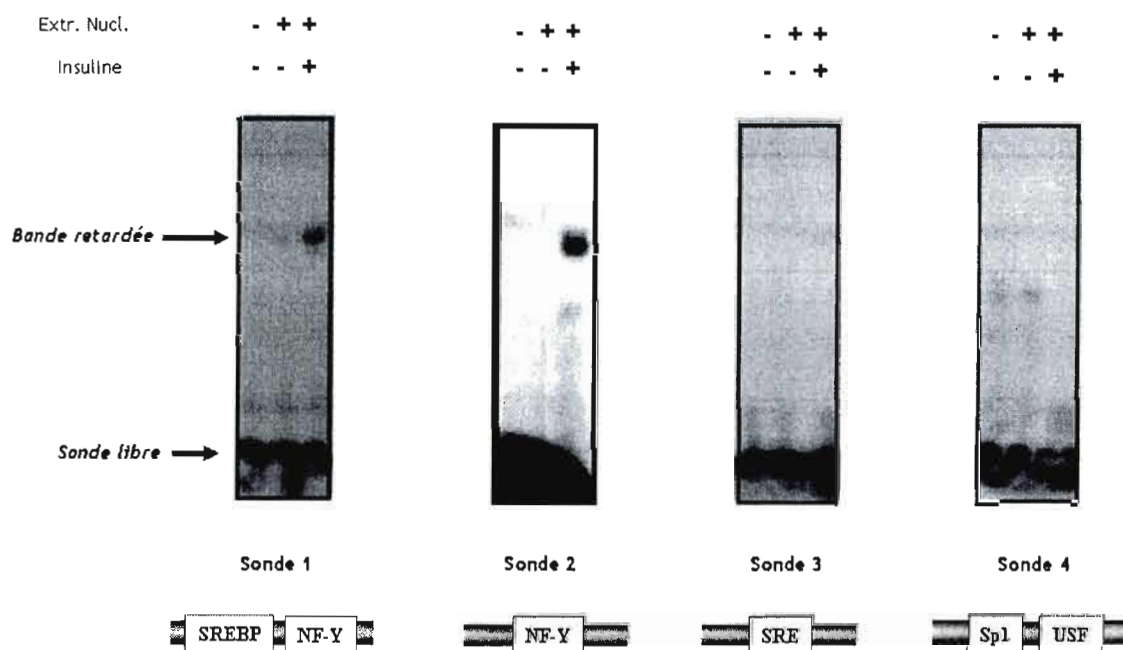


Figure 10 : Analyse de retard sur gel sur les 4 sondes synthétisées au niveau du promoteur de SCD1 en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50nM d'insuline. Au bas de la figure sont indiqués les sites putatifs de fixation de facteurs de transcription identifiés par analyse informatique. La présence de bandes retardées est indiquée ainsi que la présence des sondes libres qui n'ont pas fixé de protéines.

Les analyses de retards sur gel montrent l'apparition de bandes retardées seulement pour les sondes 1 et 2. De plus, ces bandes n'apparaissent qu'en présence d'extraits nucléaires préparés à partir de cellules HepG2 stimulées à l'insuline. La sonde 1 qui contient les sites de fixation des facteurs de transcription SREBP et NF-Y et la sonde 2 qui contient un site NF-Y fixent donc des protéines nucléaires extraites de cellules ayant été stimulées à l'insuline. La spécificité de cette fixation est démontrée par le fait qu'en utilisant les mêmes extraits nucléaires aux mêmes concentrations, aucune bande retardée n'apparaît avec les sondes 3 et 4. Ceci aussi suggère que les sites putatifs de fixation de SREBP, Sp1 et USF identifiés dans ces séquences, ne sont pas impliqués dans la régulation du gène SCD1 en réponse à l'insuline.

4. Compétitions spécifiques et mutation

Pour confirmer la spécificité de la fixation des sondes 1 et 2, on fait des réactions de compétitions spécifiques pour ces deux sondes. On rajoute au mélange des concentrations croissantes de sondes 1 ou 2 non radioactives (concentrations de 10X, 25X, 50X et 100X) et on fait la migration sur gel.

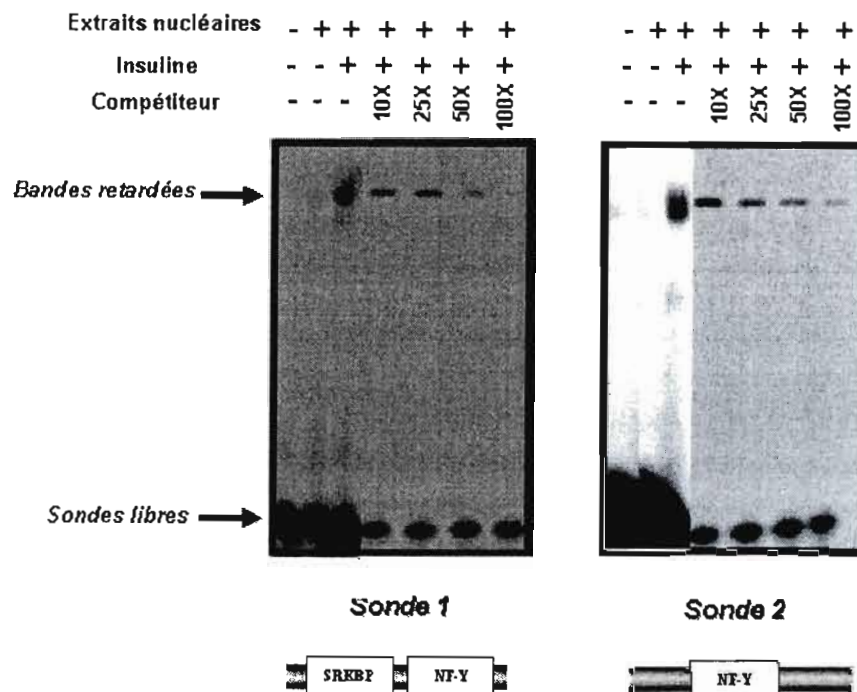


Figure 11 : Expériences de compétitions spécifiques réalisées sur les sondes 1 et 2 en présence de 6 μ g d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50nM d'insuline. La compétition a été faite par des concentrations croissantes de sondes 1 ou 2 non radioactives. La présence de bandes retardées est indiquée ainsi que la présence des sondes libres qui n'ont pas fixé de protéines.

On remarque pour la sonde 1 qu'il y'a une diminution de l'intensité des bandes retardées en fonction de l'augmentation de la concentration de la sonde non marquée qui a été rajoutée en présence d'insuline. Plus on augmente la concentration de la sonde non radioactive dans le milieu, plus elle va fixer les protéines concernées et moins il en aura pour la sonde radioactive. Ceci est expliqué par le fait qu'il y a eu compétition des deux sondes marquée et non marquée pour les mêmes facteurs de transcriptions qui sont ici SREBP et NF-Y. Ce qui confirme que c'est bien ces facteurs de transcription qui se sont fixés sur la sonde en présence d'insuline. On remarque la même chose pour la sonde 2, il y'a diminution de l'intensité des bandes retardées en présence de sondes non marquées et en présence d'insuline. Ceci est causé par la compétition des deux sondes pour le même facteur de transcription qui est dans ce cas NF-Y.

Une autre expérience a été réalisée pour confirmer la fixation de cette sonde et ceci par l'utilisation de sondes 1 et 2 mutées mises en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par l'insuline.

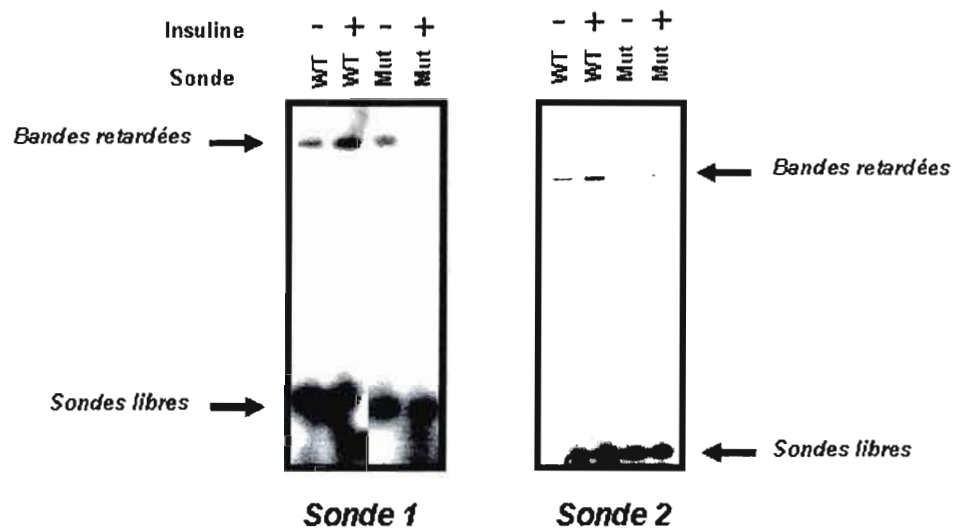


Figure 12 : Expériences de retard sur gel réalisées sur les sondes 1 et 2 mutées ou non en présence de 6 ug d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50nM d'insuline. La présence de bandes retardées est indiquée ainsi que la présence des sondes libres qui n'ont pas fixé de protéines.

Le résultat de cette expérience montre qu'il y'a une forte inhibition de la fixation des extraits nucléaires en présence de l'insuline pour les sondes mutées en comparaison avec les sondes non mutées. Ce qui confirme qu'il y a des protéines qui se sont fixées sur les sondes qui contiennent les sites de fixation de SREBP et NF-Y pour la sonde 1 et NF-Y pour la sonde 2 en présence d'insuline.

5. Analyses par Supershift

Par la suite, nous avons voulu vérifier qu'il s'agit bien des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y qui se fixaient sur les sondes 1 et 2. Pour cela, nous avons réalisé des

expériences de supershift en utilisant des anticorps spécifiques pour ces facteurs de transcription (SREBP-1 et NF-Y). La présence d'anticorps spécifiques lors de l'incubation des protéines nucléaires avec l'ADN empêche la fixation adéquate des protéines qui ont été reconnues par l'anticorps entraînant par ce fait une disparition de la bande retardée. Les anticorps spécifiques permettent donc d'identifier les protéines fixées sur la zone étudiée. Le résultat de ces analyses est présenté dans la figure 13.

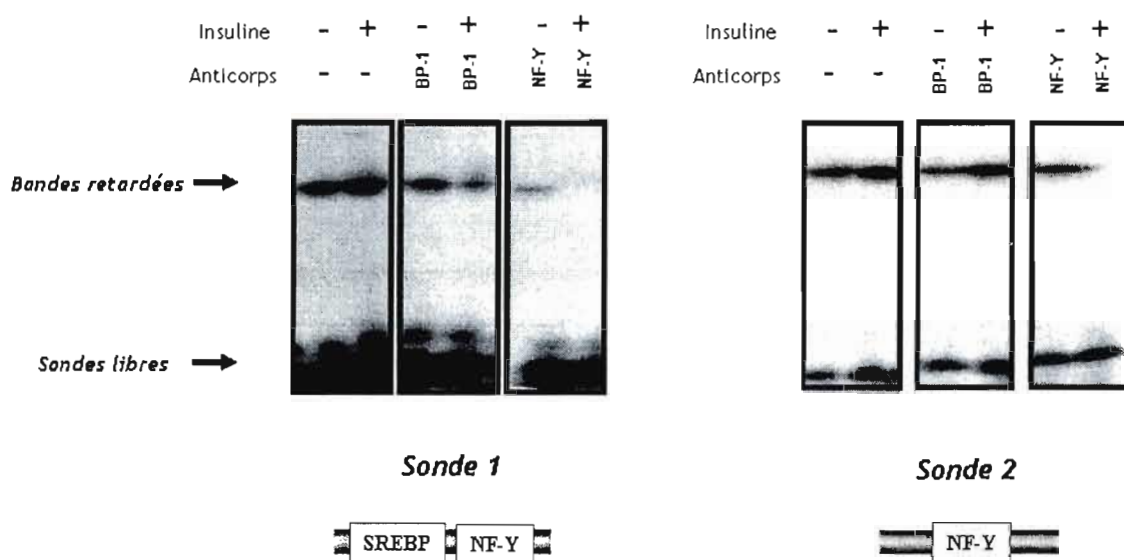


Figure 13 : Expériences de supershift réalisées sur les sondes 1 et 2 en présence d'anticorps spécifiques anti-SREBP-1 et anti-NF-Y en présence d'extraits nucléaires stimulés ou non par 50nM d'insuline. La présence de bandes retardées est indiquée ainsi que la présence des sondes libres qui n'ont pas fixé de protéines.

Il faut tout d'abord noter que nous observons l'apparition d'une bande retardée en présence d'extraits nucléaires préparés à partir de cellules non stimulées à l'insuline. Par contre, nous observons bien une nette augmentation de la fixation des protéines nucléaires lorsque celles-ci sont extraites à partir de cellules stimulées. Cela vient sans doute du fait que nous n'avons pas utilisé la même préparation d'extraits nucléaire. Ce point sera discuté par la suite. Cependant le fait qu'une bande bien plus intense est détectée lors de la présence

d'insuline valide nos résultats précédents présentés en Figure 11 suggérant que les fragments 1 et 2 contiennent bien des zones de réponse à l'insuline (**Figure 13**).

Le résultat du supershift montre que lorsque l'on incube nos réactions avec un anticorps anti-SREBP-1 et la sonde 1, on a une très importante diminution de l'intensité de la bande observée en présence d'insuline. Lorsque l'on ajoute un anticorps anti-NF-Y, on a disparition complète de cette bande. Ceci suggère qu'en présence d'insuline, il y a recrutement des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y sur la sonde 1.

Pour la sonde 2, lorsque l'anticorps anti-SREBP-1 est ajouté, il n'y a pas diminution de l'intensité de la bande (ceci étant d'ailleurs en accord avec notre analyse informatique de sites de fixation putatifs). Par contre, lorsque l'on ajoute un anticorps anti-NF-Y, il y a disparition complète de la bande. Ce qui confirme que la protéine NF-Y se fixe sur la sonde 2 en présence d'insuline confirmant aussi son implication en combinaison avec SREBP-1 dans la régulation du promoteur aviaire de SCD-1 en réponse à l'insuline.

6. Préparation de la construction SCD1-7 et mesures de l'activité luciférase

Par la suite, nous avons voulu confirmer par l'analyse de l'activité promotrice dans les cellules en culture que le fragment d'ADN contenant les sondes 1 et 2 était bien responsable d'une activation de l'activité transcriptionnelle de SCD1 en réponse à l'insuline. Ces expériences ont été réalisées dans les cellules de la lignée HepG2 pour des raisons d'efficacité de transfection.

Nous avons donc décidé de prendre la construction SCD1-6 dans laquelle nous avons éliminé un fragment de 75 paires de bases entre les bases -364 et -300 pb. Ce fragment est souligné en jaune dans la séquence présenté en figure 4. Ceci a été effectué par coupure du plasmide SCD1-6 par les enzymes de restrictions *SmaI* et *NruI* puis par ligation à nouveau (**Figure 15A**). L'enzyme *NruI* coupe à -300 pb et l'enzyme *SmaI* coupe dans le plasmide pGL2 permettant ainsi d'éliminer spécifiquement le fragment contenant les deux sites de fixation de NF-Y et un site SREBP-1 (**Figure 14**).

Après transformation, nous avons isolé le plasmide contenant le promoteur SCD1 délété de 75 paires de bases. Comme montré dans le puits 2 de la **figure 15B**, la coupure de ce nouveau plasmide appelé SCD1-7 par *Bam*HI et *Xho*I donne 2 bandes superposées de la taille attendue.

Le clonage a aussi été vérifié par l'absence du site *Nru*I qui est enlevé lors de la délétion des 75 paires de bases. Comme cela est montré dans le même gel de la **figure 15B**, l'enzyme *Nru*I ne coupe pas sur le clone SCD1-7 (puits 4) alors qu'elle coupe bien le plasmide SCD1-6 (puits 3).

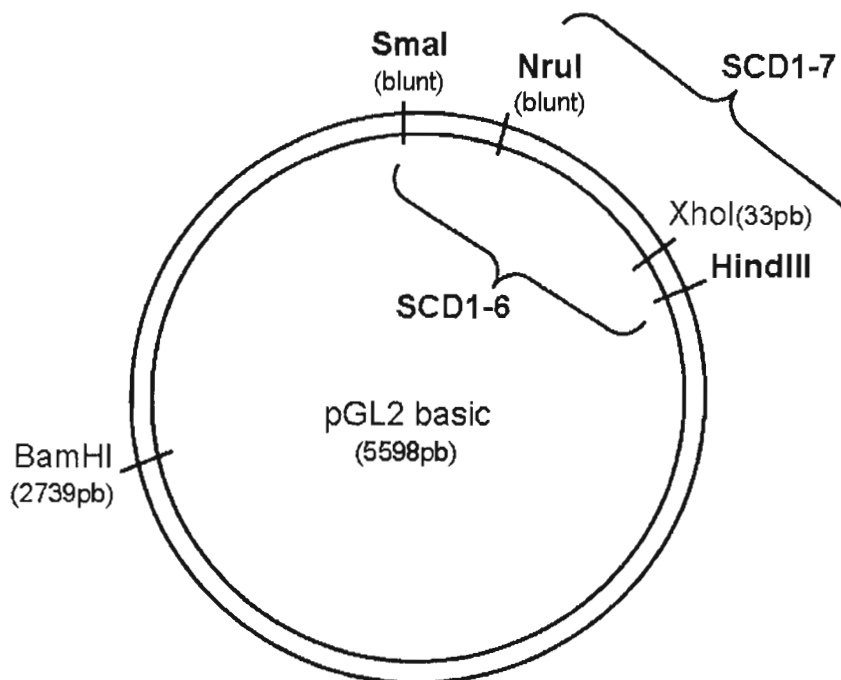


Figure 14 : Représentation schématique du vecteur *pGL2 basic* avec les inserts SCD1-6 et SCD1-7 et les différents sites d'enzymes de restriction utilisées lors du clonage.

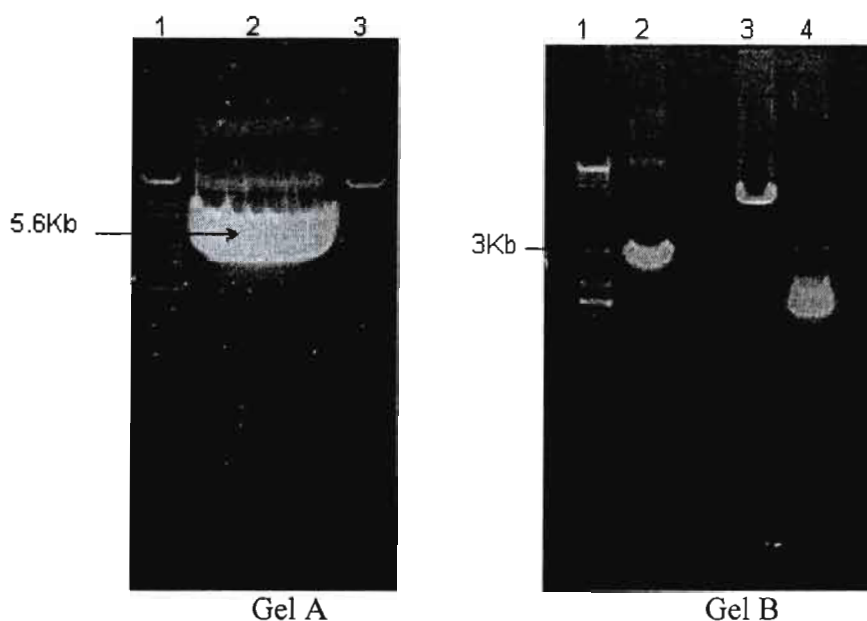


Figure 15 : Gels d'agarose (1%) effectués lors du clonage de la construction SCD1-7.

Gel A : La bande à 5.6 Kb dans le puits 2 représente le clone SCD1-6 digéré par les enzymes de restriction *SmaI* et *NruI*, dépourvue du fragment de 75 pb contenant les sites de SREBP et NF-Y.

Gel B : Les 2 bandes superposées migrant autour de 3 Kb dans le puits 2 représentent le résultat de la digestion de la construction SCD1-7 par les enzymes *BamHI* et *XhoI*.

Dans le puits 4 on visualise le résultat de la non digestion de SCD1-7 par *NruI* suite à la délétion du site de coupure de cette enzyme lors du clonage. Dans le puits 3, on visualise que cette enzyme coupe au niveau de la construction SCD1-6 qui possède le site de coupure de l'enzyme (contrôle positif de coupure par *NruI* réalisé en même temps que la réaction sur SCD1-7).

Dans les puits 1 et 3 pour le gel A et le puits 1 pour le gel B a été déposé le marqueur de taille 1Kb plus ladder (*Invitrogen*).

Par la suite, la construction SCD1-7 a été transfectée dans des cellules de la lignée HepG2 et sa réponse à l'insuline a été évaluée. Comme contrôle de l'effet de l'insuline dans nos expériences, nous avons aussi transfecté la construction SCD1-1 qui est stimulée environ 2 à 3 fois par l'insuline comme l'indique nos résultats présentés dans la figure 1 de ce mémoire et la construction SCD1-6 qui est stimulée environ 1,3 à 1,5 fois. Les résultats de ces analyses sont présentés dans la figure 17.

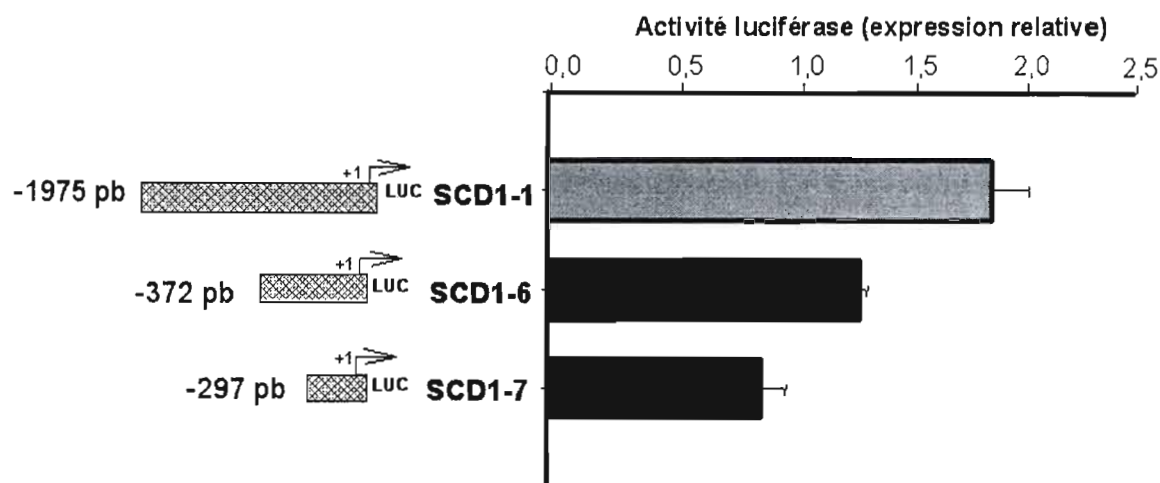


Figure 16 : Mesures des activités luciférase effectuées sur les délétions SCD1-1, SCD1-6 et SCD1-7 après stimulation par 50nM d'insuline dans les cellules HepG2. Les résultats représentent le niveau de stimulation mesuré en présence d'insuline (activité basale/activité mesurée en présence d'insuline). Ces résultats représentent la moyenne \pm la déviation standard de trois expériences indépendantes.

L'analyse des activités luciférase générées avec les constructions SCD1-1 et 6 montrent qu'il y a une augmentation de l'activité luciférase suite à des stimulations par l'insuline validant ainsi les expériences précédentes. Le résultat de la mesure de l'activité luciférase effectuée sur la délétion SCD1-7 (délétion dépourvue des sites de fixation des facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y) montre qu'il y a une disparition de l'effet de l'insuline par rapport à celui observé avec les constructions SCD1-1 et SCD1-6. Ceci confirme l'implication des éléments contenant les sites de fixation de SREBP-1 et NF-Y dans la régulation du promoteur du gène SCD1 par l'insuline.

CHAPITRE V

DISCUSSION

Comme mentionné précédemment, SCD1 est une enzyme qui joue un rôle important dans l'accumulation des lipides au niveau du tissu adipeux. Plusieurs études ont démontré que cette enzyme est liée à l'apparition de l'obésité. En effet, elle possède une activité élevée chez les sujets obèses et elle a un niveau d'expression plus faible chez les sujets maigres (*Enser 1974; Jones 1996*). De plus, des études ont montré que des souris dont le gène SCD1 n'est pas exprimé (knock-out SCD1^{-/-}) sont phénotypiquement maigres même après une alimentation riche en sucre (*Dobrzyn et Ntambi, 2004*). La compréhension des mécanismes moléculaires régissant son expression est donc indispensable pour nous permettre de comprendre le développement de ce désordre métabolique qui est l'obésité.

Cette enzyme est régulée par les nutriments tels que les glucides (régulation positive) et les acides gras polyinsaturés (régulation négative) (*Lefevre 2001*), (*Ntambi 1999*). Du côté hormonal, elle est inhibée entre autre par la leptine et le glucagon et elle est stimulée par l'insuline. La régulation de SCD1 par l'insuline se fait principalement au niveau transcriptionnel. Nous avons démontré, par des études de transfection de la partie promotrice du gène de la SCD1 dans des hépatocytes embryonnaires de poulet en culture primaire ainsi que dans les cellules de la lignée d'hépatome humain HepG2, que l'insuline stimule l'activité promotrice de SCD1 jusqu'à 2,5 fois (*Mauvoisin D. 2007*).

Il faut souligner que dans les différents modèles cellulaires utilisés (que ce soit les hépatocytes embryonnaires de poulet ou les cellules de la lignée d'hépatome humain HepG2), on a parfois rencontré des problèmes au niveau de la réponse hormonale, plus particulièrement en ce qui concerne l'insuline. Ceci peut être dû à la qualité des cellules. En effet, lorsque nous parlons de culture primaire, la qualité des cellules isolées et donc leurs réponses à différents stimuli hormonaux peut varier d'une préparation à l'autre. Ceci est souvent dû au fait que l'insuline agit par l'intermédiaire d'un récepteur membranaire, que l'état des cellules modifie beaucoup la configuration externe des membranes, et aussi la fonctionnalité du récepteur qui n'induit pas toujours la même intensité de réponse. De plus, suivant les milieux de culture utilisés, il semble que la réponse hormonale varie et cela est aussi d'autant plus vrai pour l'insuline. Par exemple,

nous avons montré que SCD1 était régulé par l'insuline par l'intermédiaire de l'activation de mTor (*Mauvoisin D. 2007*). Or, l'activité de mTor est aussi fortement influencée par la présence de certains acides aminés dans le milieu qui masquerait ainsi la réponse à l'insuline. De plus, l'ajout de glutamine dans le milieu de culture des cellules HepG2 active très fortement la voie MAPK qui inhiberait l'expression de SCD1 (*D. Mauvoisin, communication personnelle*) et masquerait aussi l'effet stimulateur de l'insuline. Toutes ces raisons expliquent pourquoi nos réponses à cette hormone semblent varier d'une expérience à l'autre et est parfois absente. C'est un problème souvent rencontré par les chercheurs travaillant sur l'insuline et qui implique une mise au point importante des conditions de stimulation afin d'obtenir une réponse maximale.

La transfection de constructions contenant différentes délétions de ce promoteur dans les cellules hépatiques HepG2 et CEH, puis la mesure de l'activité luciférase après stimulation par l'insuline montrent la présence de deux éléments de réponse à l'insuline (IRE) dans les premiers 2 Kb du promoteur. Le premier IRE se situe entre -1975 et -1610 pb et le deuxième au niveau des 372 paires de bases proximales du promoteur aviaire.

L'analyse informatique de la séquence de ce promoteur aviaire SCD1 révèle la présence de plusieurs sites consensus de fixation de facteurs de transcription connus pour leur rôle régulateur de l'action de l'insuline sur la transcription du gène (*Mounier and Posner 2006*). Dans la région du promoteur la plus en 5' qui contient IRE1, on a localisé un site consensus de fixation de USF (connu pour réguler positivement l'action de l'insuline sur l'expression du gène FAS (*Griffin et Sul, 2006*)). On a aussi localisé dans la même région un site consensus de fixation pour SREBP-1 (connu aussi pour réguler positivement l'action de l'insuline sur l'expression des gènes Acetyl CoA carboxylase (*Magana 1997*) et FAS (*Porstmann, Bertelmann et al. 2005*)). Dans la région du promoteur localisée entre -372 et -297 pb, on a caractérisé un IRE2 qui fixe SREBP-1 et NF-Y en réponse à l'insuline. Ces facteurs de transcription sont connus comme régulateurs positifs de l'action de l'insuline sur la transcription du gène (*Mounier and Posner 2006*). La comparaison de ces séquences chez différentes espèces comme le poulet, la souris et l'humain montre qu'elle est hautement conservée (*Lefevre 2001*); (*Ntambi 1999*); (*Zhang 2001*). En effet, elles contiennent toutes des éléments de

régulation conservés pour la fixation des facteurs de transcription SREBP, NF-Y, C/EBP α , NF-Y et USF. Plusieurs de ces facteurs, soit seuls ou en association avec d'autres co-facteurs, ont été impliqués dans la régulation nutritionnelle et hormonale de la transcription du gène SCD1.

Des études antérieures ont démontré que SREBP-1 est un facteur de transcription qui joue un rôle clé dans la régulation positive de la transcription des gènes par l'insuline (*Foufelle 2002*). L'expression de SREBP-1 augmente nettement avec l'expression des gènes de la lipogenèse et diminue avec l'adiposité (*Soukas 2000*). Ce qui nous permet de dire que SREBP-1 pourrait être un facteur important de la régulation du développement de l'obésité. Nous avons démontré dans notre étude que SREBP1 est aussi un facteur important pour la régulation de SCD1 par l'insuline au niveau hépatique.

D'autres études effectuées sur des hépatocytes de rats et de souris avec différents taux d'expression de SREBP-1 démontrent que ce facteur régule l'expression de la plupart des étapes de la lipogenèse (*Foretz 1999*); (*Shimano 1997*). Des sites de fixation de SREBP ont été caractérisés au niveau de promoteurs de plusieurs enzymes de la lipogenèse comme FAS, ACC, ATP citrate-lyase, S14 et SCD1 (*Bennett 1995*); (*Yin 2002*); (*Moon 2000*); (*Koo 2001*); (*Tabor 1998*). Cependant, pour SCD1, l'implication de ces sites facteurs sur la régulation de la transcription en réponse à l'insuline n'a pas été confirmée. La co-localisation de sites de fixation de SREBP et d'élément de réponse à l'insuline a été caractérisée au niveau du promoteur FAS (*Magana 1996*). Cependant, d'autres études démontrent que les sites de fixation de NF-Y et de USF qui sont situés près du site de SREBP sont aussi impliqués dans la réponse à l'insuline (*Teran-Garcia 2002*); (*Moon 2000*).

Tout ceci montre que bien que le rôle de SREBP-1 dans la régulation de l'effet de l'insuline sur la transcription des gènes de la lipogenèse incluant sans doute SCD1 semblerait être important, il apparaît maintenant évident que cela ne soit pas suffisant. L'intervention d'autres facteurs de transcription semble nécessaire afin d'obtenir une réponse maximale.

Dans notre étude, pour déterminer les facteurs de transcription impliqués dans la réponse à l'insuline au niveau de la région promotrice de SCD1, nous avons tout d'abord synthétisé des oligonucléotides contenant les différents sites de fixations des facteurs de transcription mentionnés plus haut (**Figure 4**), puis nous les avons incubé avec des extraits protéiques stimulés par l'insuline. Le résultat du band-shift montre qu'il y a apparition d'une bande retardée seulement dans les puits contenant des amorces ayant les sites de fixation de SREBP-1 et de NF-Y et en présence d'extrait nucléaire de cellules cultivées en présence d'insuline. Ceci veut dire qu'il y a des protéines qui se sont fixées sur les sites de fixation putatifs de SREBP-1 et de NF-Y causant ce retard sur le gel. Afin d'identifier ces protéines, nous avons ajouté des anticorps spécifiques anti-SREBP-1 et anti-NF-Y, et nous avons remarqué que lorsque l'on rajoute l'anticorps anti-SREBP-1, il y a diminution de l'intensité de la bande. Ceci est expliqué par le fait que l'anticorps a reconnu la protéine et est entré en compétition avec l'amorce d'ADN pour SREBP-1. Quand nous ajoutons l'anticorps anti-NF-Y, nous voyons une disparition complète de la bande, ceci est expliqué par le fait que quand l'anticorps a reconnu la protéine, il s'est fixé dessus, et ceci a causé un changement au niveau de la conformation de cette dernière qui par conséquent s'est détachée de son amorce, et par la suite on a disparition de la bande sur le gel. Les différents résultats observés avec les deux anticorps viennent sûrement du fait d'une différence d'efficacité des deux anticorps. La spécificité de ces fixations (sondes 1 et 2) a été par la suite confirmée au laboratoire par l'ajout d'un excès des compétiteurs spécifiques (sondes non marquées) entraînant une disparition des bandes retardées. A l'inverse, l'ajout de compétiteurs non spécifiques (sondes mutées et non marquées) n'influençait pas la fixation des protéines sur l'ADN (*Mauvoisin D. 2007*). Cependant, ces résultats suggèrent que comme attendu, SREBP-1 se fixe sur cette région du promoteur en réponse à l'insuline au niveau du promoteur du gène SCD1. De plus, la présence du facteur de transcription NF-Y semble aussi être importante dans cette régulation. Il est à noter qu'une diminution de la fixation du facteur NF-Y sur le promoteur SCD1 en réponse à l'action des acides gras polyinsaturés (qui inhibent la transcription) a aussi été observée (*Ntambi JM, communication personnelle*) confirmant l'implication de ce facteur de transcription dans la régulation du gène SCD1.

Pour confirmer l'implication de ces deux facteurs de transcription dans la réponse à l'insuline à ce niveau, nous avons réalisé la construction SCD1-7 dépourvue de la séquence contenant les sites de fixation de SREBP-1 et de NF-Y. La mesure de l'activité luciférase après transfection dans des cellules HepG2 et stimulation par l'insuline montre que nous avons perdu la réponse à l'insuline dans cette nouvelle construction (**Figure 9**). Ceci confirme clairement que le fragment délété contient bien un élément de réponse à l'insuline au niveau du promoteur du gène SCD1 et que les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y sont bien impliqués dans cette régulation. Reste à savoir comment se fait l'interaction entre ces deux facteurs de transcription pour qu'ils puissent bien effectuer leur rôle de régulateur à ce niveau.

Certaines études ont démontré que, seul, SREBP est un activateur de transcription inefficace et nécessite souvent l'intervention d'autres facteurs de transcription co-régulateurs pour optimiser son action. Par exemple, au niveau des promoteurs des gènes codant pour les récepteurs des LDL, de ACC et de FAS, un facteur co-régulateur Sp1 a été identifié permettant une réponse optimale à l'insuline (*Bennett 1995*); (*Lopez, J.M., 1996*); (*Sanchez, H.B., 1995*); (*Briggs, M.R., 1995*). Pour ce qui est du promoteur du gène de la farnesyl diphosphate (FPP) synthase, de la squalene synthase et de la HMG-CoA synthase, le facteur co-régulateur identifié a été comme dans le cas de notre étude sur SCD1, NF-Y (*Ericsson, J., 1996*); (*Guan, G., 1997*); (*Jackson, S.M., 1995*).

NF-Y est un facteur de transcription composé de trois sous unités différentes (A, B et C) et qui fixe le motif CCAAT dans de nombreux promoteurs eucaryotes (*Johnson, P.F., 1998*). La présence des trois sous unités est indispensable pour une reconnaissance spécifique de ce motif. Les sous unités A et C, qui sont riches en motifs de reconnaissance de l'ADN, forment un dimère qui va être reconnu par la suite par la sous unité B qui vient s'y fixer pour former un trimère capable de reconnaître l'ADN. La molécule SREBP fixe NF-Y seulement lorsque le trimère est formé, ce qui empêche la formation de complexe transcriptionnel inactif avec les sous unités individuelles de NF-Y (*Dooley, K.A., 1998*). Dans la plupart des cas, NF-Y agit en s'associant à d'autres facteurs de transcription plus spécifiques pour atteindre un niveau optimum d'activation

transcriptionnelle dans certains tissus spécifiques (*Dooley, K.A., 1998*). Par exemple, au niveau du promoteur de l'albumine, NF-Y agit en s'associant avec un membre spécifique hépatique de la famille des CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) pour attendre un niveau d'expression optimal dans le foie (*Miols, P.M., 1992*). Dans d'autres cas, au niveau du promoteur FFP synthase, NF-Y stimule la fixation du facteur de transcription SREBP pour permettre la fixation sur son SRE (*Ericsson, J., 1996*). Dans ce cas, on parle d'interaction physique indispensable entre ces deux facteurs de transcription. Ce dernier modèle pourrait sans doute s'appliquer pour SCD1. Des expériences confirmant l'interaction physique entre ces deux facteurs pourrait alors être envisagées (ex : co-immunoprécipitation).

D'un autre côté, il a été démontré que l'effet de l'insuline sur la transcription du gène SREBP-1 dans le foie et au niveau des adipocytes se fait via l'activation de PI3-kinase et de AKT (*Azzout-Marniche et al, 2000*); (*Fleischmann et al, 2000*); (*Ribaux et al, 2003*) et ceci à travers un mécanisme qui fait intervenir les facteurs de transcription LXRA (*Chen et al, 2004*). En plus, les précurseurs SREBP sont transportés en association avec SCAPS au niveau du Golgi puis libérés par les protéases S1P et S2P (*Hua 1995*); (*Nohturfft et al, 1998*); (*Sakai et al, 1998*); (*Wang 1994*). Il a été démontré que les protéines Insig 1 et 2 sont des partenaires SCAP et fonctionnent pour retenir les complexes SREBP-SCAP à l'intérieur du réticulum endoplasmique (*Yabe et al, 2002*); (*Yang et al, 2002*). L'insuline peut augmenter le niveau de SREBP-1c et SREBP-2 en diminuant le niveau de Insig-2a (*Yabe et al, 2003*) d'où l'augmentation du transfert des précurseurs SREBP au niveau du Golgi où ils seront clivés.

Comme c'est le cas pour SCD1, il a été prouvé qu'il existe une relation entre mTor et le développement de l'obésité et de plusieurs autres maladies métaboliques (*Marshall, 2006*). Il a été démontré que PI3-kinase et mTor régulent l'effet de PDGF (platelet derived growth factor) sur l'expression du gène SCD1 au niveau des fibroblastes avec une implication évidente du facteur de transcription SREBP-1 (*Demoulin et al, 2004*). En plus, plusieurs études ont impliqué la kinase mTor dans la modulation de l'expression de plusieurs autres gènes différents. En effet, l'activation de mTor est nécessaire dans

l'action inhibitrice de l'insuline dans l'expression du gène IGFBP-1 (*Band and Posner 1997*) ; (*Mounier and Posner 2006*); (*Patel and Klein 1995*). Elle a été aussi impliquée dans la phosphorylation des facteurs de transcription STAT 1 et STAT 3 nécessaires pour l'activation de la transcription des gènes STAT dépendants (*Kristof, Marks-Konczalik et al. 2003*). Il a été démontré que mTor joue aussi un rôle dans l'adipogenèse en modulant directement l'activité des facteurs de transcription PPAR γ (*Kim and Chen 2004*). D'autre part, il a été établi que la biogenèse ribosomale est contrôlée au niveau de la transcription de l'ADNr par mTor à travers l'activation des facteurs de transcription UBF et TIF1A (*Hannan, Brandenburger et al. 2003*); (*Mayer, Zhao et al. 2004*). De plus, mTor semble intervenir dans le contrôle de la transcription de plusieurs gènes, particulièrement ceux impliqués au niveau métabolique et de la biosynthèse (*Peng, Golub et al. 2002*).

Les mécanismes moléculaires de l'action de mTor sur la transcription du gène SCD1 ne sont pas encore identifiés. On ne sait pas si mTor phosphoryle directement les facteurs de transcription ciblés par l'insuline ou si son action est régulée par une autre kinase comme la p70 S6 kinase. L'analyse des acides aminés de SREBP-1 et de NF-Y révèle la présence de sites putatifs de phosphorylation de mTor et de p70 S6 kinase (*Xue, Zhou et al. 2005*). La kinase mTor pourrait réguler la transcription de SCD1 en modulant le niveau d'expression de plusieurs facteurs de transcription. En effet, une analyse par microarray montre que dans les cellules traitées par la rapamycine, l'expression du gène SREBP-1 est inhibée (*Peng, Golub et al. 2002*). Cependant, ceci devrait être confirmé par d'autres études qui seront envisagés au laboratoire de Catherine Mounier.

CHAPITRE VI

CONCLUSIONS

Les objectifs principaux de notre étude étaient, d'une part, la localisation de l'élément de réponse à l'insuline au niveau du promoteur du gène aviaire de la Stéaroyl CoA désaturase 1 et l'identification des différents facteurs de transcription impliqués dans cette réponse.

Pour la première partie, on a trouvé que l'insuline augmentait d'environ 2,5 fois le taux de transcription du gène SCD1 dans les CEH et on a pu démontrer qu'il existait deux éléments de réponse à l'insuline (IRE) au niveau du promoteur aviaire du gène de la Stéaroyl CoA désaturase 1. Le premier (IRE1) a été localisé entre -1975 et -1610 paires de bases du promoteur, alors que le deuxième (IRE2) se trouvait entre -372 et -297 paires de bases. Des expériences de retards sur gel et de supershift ont pu par la suite démontrer que les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y sont impliqués dans la régulation du gène SCD1 par l'insuline au niveau de IRE2. Ceci a été confirmé par la disparition de la réponse à l'insuline après délétion de la région qui contient les sites de fixation putatifs de ces facteurs de transcription.

L'utilisation de compétiteurs spécifiques et non spécifiques et l'absence de réponse de l'insuline lors de l'utilisation d'une mutation au niveau de cet IRE ont pu confirmer dans des études ultérieures que les facteurs de transcription SREBP-1 et NF-Y sont bel et bien impliqués dans la réponse à l'insuline au niveau du promoteur de SCD1.

Après avoir localisé l'élément de réponse à l'insuline et identifié les facteurs de transcription impliqués, il serait intéressant de connaître comment l'insuline arrive à envoyer un signal à la cellule pour modifier la fixation de ces facteurs de transcription sur la séquence promotrice. Ceci pourrait être par phosphorylation (on pourra déterminer cela par des expériences de western blot) ou bien par recrutement de co-activateurs (ceci pourrait être déterminé par l'utilisation de co-immunoprécipitations) ou bien même par changement de localisation au niveau de la cellule (des expériences de fluorescences pourraient nous éclaircir cela).

La compréhension de tous ces mécanismes moléculaires de l'action de l'insuline sur un gène comme la Stéaroyl CoA désaturase 1, qui joue un rôle tellement important dans le développement de nombreuses pathologies tel que le diabète de type 2 et l'obésité, va sûrement nous aider à trouver une solution afin de combattre ces fléaux.

RÉFÉRENCES

Agati, J. M., D. Yeagley, et al. (1998). "Assessment of the roles of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, protein kinase B, and protein kinase C in insulin inhibition of cAMP-induced phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription." J Biol Chem **273**(30): 18751-9.

Alessi, D. R. and C. P. Downes (1998). "The role of PI 3-kinase in insulin action." Biochim Biophys Acta **1436**(1-2): 151-64.

Ayala, J. E., J. N. Boustead, et al. (2004). "Insulin-mediated activation of activator protein-1 through the mitogen-activated protein kinase pathway stimulates collagenase-1 gene transcription in the MES 13 mesangial cell line." J Mol Endocrinol **33**(1): 263-80.

Azzout-Marniche, D., D. Becard, et al. (2000). "Insulin effects on sterol regulatory-element-binding protein-1c (SREBP-1c) transcriptional activity in rat hepatocytes." Biochem J **350 Pt 2**: 389-93.

Band, C. J. and B. I. Posner (1997). "Phosphatidylinositol 3'-kinase and p70s6k are required for insulin but not bisperoxovanadium 1,10-phenanthroline (bpV(phen)) inhibition of insulin-like growth factor binding protein gene expression. Evidence for MEK-independent activation of mitogen-activated protein kinase by bpV(phen)." J Biol Chem **272**(1): 138-45.

Barroso, I. and P. Santisteban (1999). "Insulin-induced early growth response gene (Egr-1) mediates a short term repression of rat malic enzyme gene transcription." J Biol Chem **274**(25): 17997-8004.

Bennett, M. K., Lopez, J.M., Sanchez, H.B., Osborne, T.F. (1995). "Sterol regulation of fatty acid synthase promoter. Coordinate feedback regulation of two major lipid pathways." J Biol Chem **270**(43): 25578-25583.

Biggs, W. H., 3rd, J. Meisenhelder, et al. (1999). "Protein kinase B/Akt-mediated phosphorylation promotes nuclear exclusion of the winged helix transcription factor FKHR1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(13): 7421-6.

Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.

Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor." Cell **96**(6): 857-68.

Bruning, J. C., J. Winnay, et al. (1997). "Differential signaling by insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 in IRS-1-deficient cells." Mol Cell Biol **17**(3): 1513-21.

Chakravarty, K., R. W. Hanson, et al. (2005). "Factors that control the tissue-specific transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase-C." Crit Rev Biochem Mol Biol **40**(3): 129-54.

Chin, J., Chang, T.Y. (1982). "Further characterization of a Chinese hamster ovary cell mutant requiring cholesterol and unsaturated fatty acid for growth." Biochemistry. **2**(13): 3196-3202.

Christy, R. J., Yang, V.W., Ntambi, J.M., Geiman, D.E., Landschulz, W.H., Friedman, A.D., Nakabeppu, Y., Kelly, T.J., Lane, M.D. (1989). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes: CCAAT/enhancer binding protein interacts with and activates the promoters of two adipocyte-specific genes." Genes Dev. **3**(9): 1323-1335.

Cichy, S. B., S. Uddin, et al. (1998). "Protein kinase B/Akt mediates effects of insulin on hepatic insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression through a conserved insulin response sequence." J Biol Chem **273**(11): 6482-7.

Coffy, S., J. F. Decaux, et al. (2005). "Identification of a novel rat hepatic gene induced early by insulin, independently of glucose." Biochem J **385**(Pt 1): 165-71.

Cohen, P., Miyazaki, M., Socci, N.D., Hagge-Greenberg, A., Liedtke, W., Soukas, A.A., Sharma, R., Hudgins, L.C., Ntambi, J.M., Friedman, J.M. (2002). "Role for stearoyl-CoA desaturase-1 in leptin-mediated weight loss." Science **298**(5593): 539-541.

Croniger, C., P. Leahy, et al. (1998). "C/EBP and the control of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription in the liver." J Biol Chem **273**(48): 31629-32.

Dentin, R., J. P. Pegorier, et al. (2004). "Hepatic glucokinase is required for the synergistic action of ChREBP and SREBP-1c on glycolytic and lipogenic gene expression." J Biol Chem **279**(19): 20314-26.

Dickens, M., C. A. Svitek, et al. (1998). "Central role for phosphatidylinositol 3-kinase in the repression of glucose-6-phosphatase gene transcription by insulin." J Biol Chem **273**(32): 20144-9.

Dignam, J. D., R. M. Lebovitz, et al. (1983). "Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei." Nucleic Acids Res **11**(5): 1475-89.

Diot, C., Lefevre, P., Herve, C., Belloir, B., Narce, M., Damon, M., Poisson, J.P., Mallard, J., Douaire, M. (2000). "Stearoyl-CoA desaturase 1 coding sequences and antisense RNA affect lipid secretion in transfected chicken LMH hepatoma cells." Arch Biochem Biophys **380**(2): 243-250.

Diraison, F., V. Yankah, et al. (2003). "Differences in the regulation of adipose tissue and liver lipogenesis by carbohydrates in humans." J Lipid Res **44**(4): 846-53.

Duong, D. T., M. E. Waltner-Law, et al. (2002). "Insulin inhibits hepatocellular glucose production by utilizing liver-enriched transcriptional inhibitory protein to disrupt the association of CREB-binding protein and RNA polymerase II with the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene promoter." J Biol Chem **277**(35): 32234-42.

Eberle, D., B. Hegarty, et al. (2004). "SREBP transcription factors: master regulators of lipid homeostasis." Biochimie **86**(11): 839-48.

Enser, M. (1974). "Desaturation of stearic acid by liver and adipose tissue from obese-hyperglycaemic mice (ob/ob)." Biochem J **148**(3): 551-555.

Feng, X., Y. Jiang, et al. (2000). "Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray." Mol Endocrinol **14**(7): 947-55.

Finlay, D., S. Patel, et al. (2004). "Glycogen synthase kinase-3 regulates IGFBP-1 gene transcription through the thymine-rich insulin response element." BMC Mol Biol **5**: 15.

Fleischmann, M. and P. B. Iynedjian (2000). "Regulation of sterol regulatory-element binding protein 1 gene expression in liver: role of insulin and protein kinase B/cAkt." Biochem J **349**(Pt 1): 13-7.

Foretz, M., C. Guichard, et al. (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12737-42.

Foretz, M., Guichard, C., Ferre, P., Foulle, F. (1999). "Sterol regulatory element binding protein-1c is a major mediator of insulin action on the hepatic expression of glucokinase and lipogenesis-related genes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12737-12742.

Foufelle, F., Ferre, P. (2002). "New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c." Biochem J. **366**(Pt 2): 377-391.

Gan, L., H. Pan, et al. (2005). "Insulin response sequence-dependent and -independent mechanisms mediate effects of insulin on glucocorticoid-stimulated insulin-like growth factor binding protein-1 promoter activity." Endocrinology **146**(10): 4274-80.

Ghosh, A. K., R. Lacson, et al. (2001). "A nucleoprotein complex containing CCAAT/enhancer-binding protein beta interacts with an insulin response sequence in the insulin-like growth factor-binding protein-1 gene and contributes to insulin-regulated gene expression." J Biol Chem **276**(11): 8507-15.

Goodridge, A. G., A. Garay, et al. (1974). "Regulation of lipogenesis and the total activities of lipogenic enzymes in a primary culture of hepatocytes from prenatal and early postnatal chicks." J Biol Chem **249**(5): 1469-75.

Goswami, R., R. Lacson, et al. (1994). "Functional analysis of glucocorticoid and insulin response sequences in the rat insulin-like growth factor-binding protein-1 promoter." Endocrinology **134**(2): 736-43.

Hall, R. K., T. Yamasaki, et al. (2000). "Regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase and insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression by insulin. The role of winged helix/forkhead proteins." J Biol Chem **275**(39): 30169-75.

Hannan, K. M., Y. Brandenburger, et al. (2003). "mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF." Mol Cell Biol **23**(23): 8862-77.

Heinemann, F. S. and J. Ozols (2003). "Stearoyl-CoA desaturase, a short-lived protein of endoplasmic reticulum with multiple control mechanisms." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **68**(2): 123-33.

Hua, X., Wu, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Hobbs, H.H. (1995). "Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13." Genomics, **25**(3): 667-673.

Iizuka, K., R. K. Bruick, et al. (2004). "Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(19): 7281-6.

- Imai, E., J. N. Miner, et al. (1993). "Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids." J Biol Chem **268**(8): 5353-6.
- Imai, E., P. E. Stromstedt, et al. (1990). "Characterization of a complex glucocorticoid response unit in the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." Mol Cell Biol **10**(9): 4712-9.
- Ish-Shalom, D., C. T. Christoffersen, et al. (1997). "Mitogenic properties of insulin and insulin analogues mediated by the insulin receptor." Diabetologia **40 Suppl 2**: S25-31.
- Ishii, S., K. Iizuka, et al. (2004). "Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(44): 15597-602.
- Jones, B. H., Maher, M.A., Banz, W.J., Zemel, M.B., Whelan, J., Smith, P.J., Moustaid, N. (1996). "Adipose tissue stearoyl-CoA desaturase mRNA is increased by obesity and decreased by polyunsaturated fatty acids." Am J Physiol. 1996 Jul;271(1 Pt 1):E44-9 **271**(1 Pt 1): E44-E49.
- Joshi, V. C., Aranda, L.P. (1979). "Hormonal regulation of the terminal enzyme of microsomal stearoyl coenzyme A desaturase in cultured avian liver explants. Role of insulin." J. Biol Chem. **254**(23): 11779-11782.
- Jurado, L. A., S. Song, et al. (2002). "Conserved amino acids within CCAAT enhancer-binding proteins (C/EBP(alpha) and beta) regulate phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression." J Biol Chem **277**(31): 27606-12.
- Kang, K., M. Miyazaki, et al. (2004). "Evidence that the anti-obesity effect of conjugated linoleic acid is independent of effects on stearoyl-CoA desaturase1 expression and enzyme activity." Biochem Biophys Res Commun **315**(3): 532-7.
- Katsurada, A., N. Iritani, et al. (1989). "Effects of insulin and fructose on transcriptional and post-transcriptional regulation of malic enzyme synthesis in diabetic rat liver." Biochim Biophys Acta **1004**(1): 103-7.
- Kawashima, Y., Hanioka, N., Matsumura, M., Kozuka, H. (1983). "Induction of microsomal stearoyl-CoA desaturation by the administration of various peroxisome proliferators." Biochim Biophys Acta. **752**(2): 259-264.
- Keeton, A. B., K. D. Bortoff, et al. (2003). "Insulin-regulated expression of Egr-1 and Krox20: dependence on ERK1/2 and interaction with p38 and PI3-kinase pathways." Endocrinology **144**(12): 5402-10.

- Khan, M. N., Baquiran, G., Brule, C., Burgess, J. , Foster, B., Bergeron, J.J. and Posner, B.I. (1989). "Internalization and activation of the rat liver insulin receptor kinase in vivo." J. Biol. Chem. **264**(22): 12931-12940.
- Khoo, D. E., Fermor, B., Miller, J., Wood, C.B., Apostolov, K., Barker, W., Williamson, R.C., Habib, N.A. (1991). "Manipulation of body fat composition with sterculic acid can inhibit mammary carcinomas in vivo." Br J Cancer. **63**(1): 97-101.
- Kim, J. E. and J. Chen (2004). "regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activity by mammalian target of rapamycin and amino acids in adipogenesis." Diabetes **53**(11): 2748-56.
- Koo, S. H., Dutcher, A.K., Towle, H.C. (2001). "Glucose and insulin function through two distinct transcription factors to stimulate expression of lipogenic enzyme genes in liver." J. Biol Chem. **276**(12): 9437-9445.
- Kristof, A. S., J. Marks-Konczalik, et al. (2003). "Stimulation of signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1)-dependent gene transcription by lipopolysaccharide and interferon-gamma is regulated by mammalian target of rapamycin." J Biol Chem **278**(36): 33637-44.
- Lakshmanan, M. R., C. M. Nepokroeff, et al. (1972). "Control of the synthesis of fatty-acid synthetase in rat liver by insulin, glucagon, and adenosine 3':5' cyclic monophosphate." Proc Natl Acad Sci U S A **69**(12): 3516-9.
- Latasa, M. J., M. J. Griffin, et al. (2003). "Occupancy and function of the -150 sterol regulatory element and -65 E-box in nutritional regulation of the fatty acid synthase gene in living animals." Mol Cell Biol **23**(16): 5896-907.
- Lee, W. M., Ishikawa, M., Ahlquist, P. (2001). "Mutation of host delta9 fatty acid desaturase inhibits brome mosaic virus RNA replication between template recognition and RNA synthesis." J Virol. 2001 Mar;**75**(5):2097-106. **75**(5): 2097-2106.
- Lefevre, P., Diot, C., Legrand, P., Douaire, M. (1999). "Hormonal regulation of stearoyl coenzyme-A desaturase 1 activity and gene expression in primary cultures of chicken hepatocytes." Arch Biochem Biophys. **368**(2): 329-337.
- Lefevre, P., Tripon, E., Plumelet, C., Douaire, M., Diot, C. (2001). "Effects of polyunsaturated fatty acids and clofibrate on chicken stearoyl-coA desaturase 1 gene expression." Biochem Biophys Res Commun. **280**(1): 25-31.

Legrand, P., Hermier, D. (1992). "Hepatic delta 9 desaturation and plasma VLDL level in genetically lean and fat chickens." Int J Obes Relat Metab Disord. **16**(4): 289-294.

Leveille, G. A., D. R. Romsos, et al. (1975). "Lipid biosynthesis in the chick. A consideration of site of synthesis, influence of diet and possible regulatory mechanisms." Poult Sci **54**(4): 1075-93.

Li, J., Ding, S.F., Habib, N.A., Fermor, B.F., Wood, C.B., Gilmour, R.S. (1994). "Partial characterization of a cDNA for human stearyl-CoA desaturase and changes in its mRNA expression in some normal and malignant tissues." Int J Cancer. **57**(3): 348-352.

Liao, J., A. Barthel, et al. (1998). "Activation of protein kinase B/Akt is sufficient to repress the glucocorticoid and cAMP induction of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene." J Biol Chem **273**(42): 27320-4.

Ma, L., N. G. Tsatsos, et al. (2005). "Direct role of ChREBP.Mlx in regulating hepatic glucose-responsive genes." J Biol Chem **280**(12): 12019-27.

Magana, M. M., S. H. Koo, et al. (2000). "Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase." J Biol Chem **275**(7): 4726-33.

Magana, M. M., Lin, S.S., Dooley, K.A., Osborne, T.F. (1997). "Sterol regulation of acetyl coenzyme A carboxylase promoter requires two interdependent binding sites for sterol regulatory element binding proteins." J Lipid Res. **38**(8): 1630-1638.

Magana, M. M., Osborne, T.F. (1996). "Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter." J Biol Chem. **271**(51): 32689-32694.

Mamounas, M., S. Ross, et al. (1991). "Analysis of the genes involved in the insulin transmembrane mitogenic signal in Chinese hamster ovary cells, CHO-K1, utilizing insulin-independent mutants." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(9): 3530-4.

Matsumoto, M., W. Ogawa, et al. (2002). "Role of the insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway in insulin-induced expression of sterol regulatory element binding protein 1c and glucokinase genes in rat hepatocytes." Diabetes **51**(6): 1672-80.

Mauvoisin D., Rocque G., Arfa O., Radenne A. and Mounier C. (2007). "Role of the PI3-kinase/mTor pathway in the regulation of the stearyl CoA desaturase (SCD1) gene expression by insulin in liver." J. Cell Commun. Signal. **1**: 113–125.

- Mayer, C., J. Zhao, et al. (2004). "mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability." Genes Dev **18**(4): 423-34.
- Miyazaki, M., A. Dobrzyn, et al. (2004). "Stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression is necessary for fructose-mediated induction of lipogenic gene expression by sterol regulatory element-binding protein-1c-dependent and -independent mechanisms." J Biol Chem **279**(24): 25164-71.
- Moon, Y. A., Lee, J.J., Park, S.W., Ahn, Y.H., Kim, K.S. (2000). "The roles of sterol regulatory element-binding proteins in the transactivation of the rat ATP citrate-lyase promoter." J Biol Chem. **275**(39): 30280-30286.
- Moon, Y. S., M. J. Latasa, et al. (2002). "Suppression of fatty acid synthase promoter by polyunsaturated fatty acids." J Lipid Res **43**(5): 691-8.
- Moon, Y. S., Latasa, M.J., Kim, K.H., Wang, D., Sul, H.S. (2000). "Two 5'-regions are required for nutritional and insulin regulation of the fatty-acid synthase promoter in transgenic mice." J Biol Chem. **275**(14): 10121-10127.
- Mounier, C. and B. I. Posner (2006). "Transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene." Can J Physiol Pharmacol **84**(7): 713-24.
- Nadeau, K. J., J. W. Leitner, et al. (2004). "Insulin regulation of sterol regulatory element-binding protein-1 expression in L-6 muscle cells and 3T3 L1 adipocytes." J Biol Chem **279**(33): 34380-7.
- Naima Moustaid, R. S. B. H. S. S. (1994). "identification of an insulin response element in the fatty acid synthetase promoter." the journal of biological chemistry **269**, No 8(february 25): 5629-5634.
- Nasrin, N., S. Ogg, et al. (2000). "DAF-16 recruits the CREB-binding protein coactivator complex to the insulin-like growth factor binding protein 1 promoter in HepG2 cells." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(19): 10412-7.
- Neau, E., D. Chambéry, et al. (1995). "Multiple liver-enriched trans-acting factors interact with the glucocorticoid- (GRU) and cAMP-(CRU) responsive units within the h-IGFBP-1 promoter." Prog Growth Factor Res **6**(2-4): 103-17.
- Ntambi, J. M. (1992). "Dietary regulation of stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression in mouse liver." J Biol Chem. **267**(15): 10925-10930.
- Ntambi, J. M. (1999). "Regulation of stearoyl-CoA desaturase by polyunsaturated fatty acids and cholesterol." J Lipid Res **40**(9): 1549-58.

Ntambi, J. M., Buhrow, S.A., Kaestner, K.H., Christy, R.J., Sibley, E., Kelly, T.J. Jr., Lane, M.D. (1988). "Differentiation-induced gene expression in 3T3-L1 preadipocytes. Characterization of a differentially expressed gene encoding stearoyl-CoA desaturase." J Biol Chem. **263**(33): 17291-17300.

Ntambi, J. M. and M. Miyazaki (2004). "Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism." Prog Lipid Res **43**(2): 91-104.

Ntambi, J. M., Miyazaki, M., Stoehr, J.P., Lan, H., Kendzierski, C.M., Yandell, B.S., Song, Y., Cohen, P., Friedman, J.M., Attie, A.D. (2002). "Loss of stearoyl-CoA desaturase-1 function protects mice against adiposity." Proc Natl Acad Sci U S A. **99**(17): 11482-11486.

Ogg, S., S. Paradis, et al. (1997). "The Fork head transcription factor DAF-16 transduces insulin-like metabolic and longevity signals in *C. elegans*." Nature **389**(6654): 994-9.

Ozols, J. (1997). "Degradation of Hepatic Stearyl CoA Δ^9 -Desaturase." Mol Biol Cell. **8**(11): 2281-2290.

Patel, C. A. and J. M. Klein (1995). "Outcome of infants with birth weights less than 1000 g with respiratory distress syndrome treated with high-frequency ventilation and surfactant replacement therapy." Arch Pediatr Adolesc Med **149**(3): 317-21.

Patel, S., P. A. Lochhead, et al. (2002). "Insulin regulation of insulin-like growth factor-binding protein-1 gene expression is dependent on the mammalian target of rapamycin, but independent of ribosomal S6 kinase activity." J Biol Chem **277**(12): 9889-95.

Paulauskis, J. D. and H. S. Sul (1989). "Hormonal regulation of mouse fatty acid synthase gene transcription in liver." J Biol Chem **264**(1): 574-7.

Peng, T., T. R. Golub, et al. (2002). "The immunosuppressant rapamycin mimics a starvation-like signal distinct from amino acid and glucose deprivation." Mol Cell Biol **22**(15): 5575-84.

Porstmann, A. U., E. Bertelmann, et al. (2005). "[Acute worsening of vision in an HIV-positive female patient with a helper cell level of over 200/microl.]." Ophthalmologie **102**(8): 816-9.

Postner, C. M. e. B. I. (2006). "transcriptional regulation by insulin: from the receptor to the gene." Can. J. Physiol. Pharmacol **84**.

Puigserver, P., J. Rhee, et al. (2003). "Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1 α interaction." Nature **423**(6939): 550-5.

Roncero, C. and A. G. Goodridge (1992). "Regulation of the malic enzyme and fatty acid synthase genes in chick embryo hepatocytes in culture: corticosterone and carnitine regulate responsiveness to triiodothyronine." Arch Biochem Biophys **295**(2): 258-67.

Roth, G., Kotzka, J., Kremer, L., Lehr, S., Lohaus, C., Meyer, H.E., Krone, W., Muller-Wieland, D. (2000). "MAP kinases Erk1/2 phosphorylate sterol regulatory element-binding protein (SREBP)-1 α at serine 117 in vitro." J Biol Chem **275**(43): 33302-33307.

Schmoll, D., K. S. Walker, et al. (2000). "Regulation of glucose-6-phosphatase gene expression by protein kinase B α and the forkhead transcription factor FKHR. Evidence for insulin response unit-dependent and -independent effects of insulin on promoter activity." J Biol Chem **275**(46): 36324-33.

Schwarz, J. M., P. Linfoot, et al. (2003). "Hepatic de novo lipogenesis in normoinsulinemic and hyperinsulinemic subjects consuming high-fat, low-carbohydrate and low-fat, high-carbohydrate isoenergetic diets." Am J Clin Nutr **77**(1): 43-50.

Sekiya, M., N. Yahagi, et al. (2003). "Polyunsaturated fatty acids ameliorate hepatic steatosis in obese mice by SREBP-1 suppression." Hepatology **38**(6): 1529-39.

Shimano, H., Shimomura, I., Hammer, R.E., Herz, J., Goldstein, J.L., Brown, M.S., Horton, J.D. (1997). "Elevated levels of SREBP-2 and cholesterol synthesis in livers of mice homozygous for a targeted disruption of the SREBP-1 gene." J Clin Invest **100**(8): 2115-2124.

Shimano, H., Yahagi, N., Amemiya-Kudo, M., Hasty, A.H., Osuga, J., Tamura, Y., Shionoiri, F., Iizuka, Y., Ohashi, K., Harada, K., Gotoda, T., Ishibashi, S., Yamada, N. (1999). "Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes." J. Biol Chem **274**(50): 35832-35839.

Shimomura, I., Y. Bashmakov, et al. (1999). "Insulin selectively increases SREBP-1c mRNA in the livers of rats with streptozotocin-induced diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(24): 13656-61.

- Shrago, E., H. A. Lardy, et al. (1963). "Metabolic and Hormonal Control of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase and Malic Enzyme in Rat Liver." J Biol Chem **238**: 3188-92.
- Soukas, A., Cohen, P., Socci, N.D., Friedman, J.M. (2000). "Leptin-specific patterns of gene expression in white adipose tissue." Genes Dev. **14**(8): 963-980.
- Spence, J. T. and H. C. Pitot (1982). "Induction of lipogenic enzymes in primary cultures of rat hepatocytes. Relationship between lipogenesis and carbohydrate metabolism." Eur J Biochem **128**(1): 15-20.
- Srivastava, A. K. and S. K. Pandey (1998). "Potential mechanism(s) involved in the regulation of glycogen synthesis by insulin." Mol Cell Biochem **182**(1-2): 135-41.
- Sul, D. W. a. H. (1995). "upstream stimulatory factors bind to insulin response sequence of the fatty acid synthetase promoter." JBC **270**: 28716-28722.
- Sutherland, C., R. M. O'Brien, et al. (1995). "Phosphatidylinositol 3-kinase, but not p70/p85 ribosomal S6 protein kinase, is required for the regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) gene expression by insulin. Dissociation of signaling pathways for insulin and phorbol ester regulation of PEPCK gene expression." J Biol Chem **270**(26): 15501-6.
- Sutherland, C., M. Waltner-Law, et al. (1998). "Activation of the ras mitogen-activated protein kinase-ribosomal protein kinase pathway is not required for the repression of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene transcription by insulin." J Biol Chem **273**(6): 3198-204.
- Suwanichkul, A., S. V. Allander, et al. (1994). "Glucocorticoids and insulin regulate expression of the human gene for insulin-like growth factor-binding protein-1 through proximal promoter elements." J Biol Chem **269**(49): 30835-41.
- Tabor, D. E., Kim, J.B., Spiegelman, B.M., Edwards, P.A. (1998). "Transcriptional activation of the stearoyl-CoA desaturase 2 gene by sterol regulatory element-binding protein/adipocyte determination and differentiation factor 1." J Biol Chem. **273**(34): 22052-22058.
- Takaishi, H., H. Konishi, et al. (1999). "Regulation of nuclear translocation of forkhead transcription factor AFX by protein kinase B." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(21): 11836-41.
- Taouis, M., S. Dridi, et al. (2001). "Chicken leptin: properties and actions." Domest Anim Endocrinol **21**(4): 319-27.

- Teran-Garcia, M., Rufo, C., Nakamura, M.T., Osborne, T.F., Clarke, S.D. (2002). "NF-Y involvement in the polyunsaturated fat inhibition of fatty acid synthase gene transcription." Biochem Biophys Res Commun. **290**(4): 1295-1299.
- Thiede, M. A., Strittmatter, P. (1985). "The induction and characterization of rat liver stearyl-CoA desaturase mRNA." J Biol Chem. **260**(27): 14459-14463.
- Vernon, R. J., M. C. Barber, et al. (1999). "Développements récents dans les études de la lipogenèse chez l'Homme et chez les animaux." Productions animales **12**(4): 319-327.
- Voet, D. and J. G. Voet (1998). Biochimie, DeBoeck Université.
- Wang, D. and H. S. Sul (1998). "Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt." J Biol Chem **273**(39): 25420-6.
- Wang, D., Sul, H.S. (1998). "Insulin stimulation of the fatty acid synthase promoter is mediated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. Involvement of protein kinase B/Akt." J Biol Chem. **273**(39): 25420-25406.
- Wang, X., Sato, R., Brown, M.S., Hua, X., Goldstein, J.L. (1994). "SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis." Cell. **77**(1): 17-9.
- Waters, K. M., C. W. Miller, et al. (1997). "Localization of a polyunsaturated fatty acid response region in stearoyl-CoA desaturase gene 1." Biochim Biophys Acta **1349**(1): 33-42.
- Waters, K. M., Ntambi, J.M. (1994). "Insulin and dietary fructose induce stearoyl-CoA desaturase 1 gene expression of diabetic mice." J Biol Chem. **269**(44): 27773-27777.
- Xue, Y., F. Zhou, et al. (2005). "GPS: a comprehensive www server for phosphorylation sites prediction." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W184-7.
- Yamamoto, T., H. Shimano, et al. (2004). "SREBP-1 interacts with hepatocyte nuclear factor-4 alpha and interferes with PGC-1 recruitment to suppress hepatic gluconeogenic genes." J Biol Chem **279**(13): 12027-35.
- Yenush, L., C. Zanella, et al. (1998). "The pleckstrin homology and phosphotyrosine binding domains of insulin receptor substrate 1 mediate inhibition of apoptosis by insulin." Mol Cell Biol **18**(11): 6784-94.

Yin, L., Zhang, Y., Hillgartner, F.B. (2002). "Sterol regulatory element-binding protein-1 interacts with the nuclear thyroid hormone receptor to enhance acetyl-CoA carboxylase- α transcription in hepatocytes." J Biol Chem. **277**(22): 19554-19565.

Yoon, J. C., P. Puigserver, et al. (2001). "Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1." Nature **413**(6852): 131-8.

Zhang, L., Ge, L., Tran, T., Stenn, K. and Prouty, S.M. (2001). "Isolation and characterization of the human stearoyl-CoA desaturase gene promoter: requirement of a conserved CCAAT cis-element." Biochem. J. **357**(Pt 1): 183-193.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J.M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature. **374**(6518): 124.